

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der
Ludwigs-Maximilians-Universität
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

unter der wissenschaftlichen Leitung von
em. Prof. Dr. Dr. h.c. Peter C. Scriba

Glykosylierungen des Thyroxin-bindenden Globulins

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der medizinischen Fakultät der
Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sandra Simone Wagner
aus
Sonthofen
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: em. Prof. Dr. med. Roland Gärtner

Mitberichterstatter: apl. Prof. Dr. Ludwig Schaaf, MPI für Psychiatrie München
Priv. Doz. Dr. Stefan Schopf, Bad Aibling
apl. Prof. Dr. Klaus Hallfeldt, LMU München

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: em. Prof. Dr. med. Roland Gärtner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 13. November 2020

Auszüge dieser Arbeit wurden auf dem Congress „Annual Meeting of the American Thyroid Association“ in San Diego, USA, vom 14. – 17. November 1996 vorgestellt.

Widmung

Meinem Großvater, der mir das Urvertrauen mitgab, alles sei erreichbar, wenn man es mit genug Energie anstrebe.

Meiner Mutter, die mir ihr Durchhaltevermögen zumindest größtenteils vererbte und den Glauben an den menschlichen Intellekt mitgab.

Meinem Vater, der für mich die Personifikation eines wissenschaftlichen Geistes ist.

Meinem Mann, der mit mir schon das halbe Universum durchdiskutiert hat.

Die andere Hälfte fehlt uns noch.

Inhalt

1 Einleitung	7
1.1 Vorbemerkung.....	7
1.2 Ziel dieser Arbeit.....	7
2 Einführung	8
2.1 Zellen, Gene, Proteine	8
2.2 Vom Gen zum Protein.....	10
2.3 Posttranslationale Modifikationen	11
2.4 Expression des gesuchten Gens.....	12
2.5 Glykoproteine	13
2.6 Informationsübertragung in höheren Wirbeltieren	18
2.7 Die Schilddrüse (Glandula Thyroidea)	18
2.7.1 Anatomie	18
2.7.2 Funktion der Schilddrüse	18
2.7.3 Wirkungsweise der Schilddrüsenhormone	19
2.7.4 Störungen der Schilddrüsenfunktion	19
2.7.5 Schilddrüsenhormone	20
2.7.6 Die Deiodasen.....	21
2.7.7 Wirkorte von Schilddrüsenhormonen	22
2.7.8 Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR)	24
2.8 Das Thyroxin-bindende Globulin, ein Serpin	24
2.8.1 Die Proteinfamilie der Serpine	24
2.9.2 Charakteristika des Thyroxin-bindendes Globulins.....	27
2.9.3 Genetik des SERPINA7-Gens (TBG-Gen)	29
2.9.4 Glykosylierungen des TBGs.....	30
3 Methoden und Ergebnisse	32
3.1 Herstellung von Glykosylierungsmutanten des Thyroxin-bindenden Globulins.....	32
3.1.1 Klonierung des TBG-Gens in den pSelect-Vector und gerichtete Mutagenese	32
3.1.1 Herstellung einzelsträngiger Vektor-DNA	35
3.1.2 Gerichtete Mutagenese.....	35
3.1.3 Transformation in <i>E. coli</i>	36
3.2 Überprüfung der Mutagenese durch DNA-Sequenzierung.....	37

3.3 Expression der mutierten TBG-Varianten <i>in vitro</i>	39
3.3.1 Expression im Retikulozytenlysat	39
3.3.2 <i>In vitro</i> -Translation: <i>Xenopus laevis</i> - Oozyten	43
3.3.3 Analyse der exprimierten Proteine durch Elektrophorese (SDS-PAGE)	45
3.3.4 Analyse durch T ₄ -Bindungsassay	47
3.5.3 Scatchard-Analyse	49
4 Diskussion	52
5 Zusammenfassung	58
6 Verwendete Materialien und Methoden	59
6.1 Inhaltsverzeichnis der Methoden und Lösungen	59
6.2 Methoden und Lösungen	62
6.3 Gen- und Proteinsequenzen	80
6.4 Bezugsquellen	86
7 Abkürzungen	90
8 Abbildungsverzeichnis	93
9 Literaturverzeichnis	95
10 Danksagung	103
11 Eidesstattliche Versicherung	104

Glykosylierungen des Thyroxin-bindenden Globulins

1 Einleitung

1.1 Vorbemerkung

Diese Arbeit wurde von September 1993 bis November 1997 am Klinikum Innenstadt (heute Medizinische Klinik und Poliklinik IV) der Ludwigs-Maximilians-Universität München durchgeführt. Durch eine unglückliche, lange Unterbrechung kam es erst im Frühjahr 2020 dazu, dass sie schriftlich zu Ende formuliert und letztlich eingereicht werden konnte. Die praktischen Arbeiten stammen alle aus der Zeit 1993-1997.

Bei der Abfassung dieser Arbeit in der aktuell vorliegenden Form wurden die theoretischen Grundlagen mit dem heutigen Stand der Forschung verglichen, überarbeitet und aktualisiert.

1.2 Ziel dieser Arbeit

Das Thyroxin-bindende Globulin (TBG), das wichtigste Transportprotein der Schilddrüsenhormone, gehört zur Proteinsuperfamilie der Serpine (**Ser**in **Pro**tease **I**nhibitor). Es ist das Haupttransportprotein für T₄ (3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin) im menschlichen Serum und hat eine bemerkenswert hohe Bindungsaffinität zu seinem Liganden T₄. Das TBG wird beim Menschen in der Leber (Kleine und Rossmanith 2007), im Blut, den Nieren und im Herzen (Heit 2013) produziert und anschließend ins Serum sezerniert.

TBG ist ein aus 415 Aminosäurebausteinen bestehendes Glykoprotein, das fünf potenzielle Glykosylierungsstellen in seiner Primärstruktur trägt. Ausgangspunkt dieser Arbeit war, die genaue Bedeutung der Glykosylierungen für Struktur und Funktion des TBGs herauszufinden. Bekannt war, dass die Serumclearance durch das Maß der Glykosylierung beeinflusst wird wie bei vielen anderen Serumproteinen auch, jedoch war unklar, inwieweit auch die weitere Faltung und damit die räumliche Struktur des Bindungsproteins durch die Zuckerreste beeinflusst wird und eventuell sogar essenziell für die korrekte Funktion ist.

Hierzu wurde aus dem Gen des menschlichen TBGs jede der fünf potentiellen Stellen für die Glykosylierung des TBG-Gens einzeln durch einen Basenaustausch entfernt. Anschließend wurden aus den mutierten DNAs synthetische messenger-RNAs hergestellt und diese wiederum zur Expression der mutierten Genprodukte verwendet.

Die so künstlich hergestellten, modifizierten TBG-Proteine, die weniger Glykosylierungsstellen als die Wildform enthielten bzw. gar keine mehr, wurden analysiert und ihre spezifische Bindungsaffinität an Thyroxin gemessen, um eine fundierte Aussage über den Einfluss der Zuckerketten auf den räumlichen Bau, die Sekretion und Wirkungsweise des Thyroxin-bindenden Globulins treffen zu können.

2 Einführung

2.1 Zellen, Gene, Proteine

Die Zelle steht am Beginn dessen, was wir als Lebewesen bezeichnen. Nicht umsonst gehört der „Aufbau aus Zellen“ zu jenen fünf essenziellen Kriterien des Lebens, auf die sich Wissenschaftler in aller Welt geeinigt haben. Interessant ist die Frage, was eine Zelle ist und wie sie funktioniert, wie das Zusammenleben vieler Zellen in einem Organ oder Organismus im Detail geregelt wird. Langsam beginnen wir diese Zusammenhänge zu verstehen, und doch fehlen uns noch viele Details.

1665 entdeckte Robert Hooke mit einem einfachen Mikroskop die ersten Zellen in einer Korkschicht. Erst 1839 wies Theodor Schwann nach, dass tierische Organismen aus Zellen gebaut sind und dass das Plasma der eigentliche Träger der Lebensvorgänge ist. Heute unterscheiden wir die Welt der Prokaryoten von der der Eukaryoten anhand des Aufbaus ihrer Zellen und einiger biochemischer Unterschiede. Prokaryoten teilen sich auf in Archaeen und Eubakterien, die erstaunliche Stoffwechselleistungen vollführen können, insbesondere die Archaeen. Eubakterien sind den Eukaryoten viel ähnlicher und dennoch davon verschieden. Die Welt der Eukaryoten reicht von einsam lebenden Einzellern über komplexe Organismen mit ausgeprägten Sozialstaaten wie Ameisen bis hin zum Menschen, der in seine Umgebung eingreift und seine Welt verändert wie kein anderer Organismus vor ihm auf diesem Planeten. Die schiere Vielfalt an Lebensformen und die Komplexität der Interaktionen auf jeder Ebene, von Biosphäre, Biotop, Lebewesen, Organsystem, Organ, Zelle, Organellen bis zu den Molekülinteraktionen scheint kaum fassbar zu sein. Doch vergessen wir dabei schnell, dass in den dreieinhalb oder vielleicht auch vier Milliarden Jahren Evolution seit der Entstehung der ersten Zellen sich die Lebewesen zumindest auf Zellebene gar nicht so weit auseinanderentwickelt haben. Die Grundlagen der Biochemie, der Genetik und des Stoffwechsels sind so universell, dass sie im Umkehrschluss längst ein Beweis für die Verwandtschaft aller Lebensformen auf der Erde und ihres gemeinsamen Urahren sind.

Gehen wir einmal ganz zum Anfang: die eukaryotischen Zellen, aus denen auch wir Menschen aufgebaut sind, entstanden nach der Endosymbiontentheorie durch Endozytose in der Frühzeit der Erde. Gefräßige Zellen verschlangen andere, kleinere Zellen, verdauten sie jedoch nicht vollständig. Einige überlebten in den großen Zellen und wurden zu deren Symbionten, wie wir sie heute kennen. Die grünen Chloroplasten der Pflanzen und die Mitochondrien bei Tieren, Pilzen und Pflanzen sind nachweislich bakteriellen, also prokaryotischen Ursprungs. Sie unterscheiden sich signifikant vom Rest der Zelle durch bakterielle, nicht eukaryotische Ribosomen und das Vorhandensein eigener DNA und sind damit gleichzeitig den freilebenden Eubakterien ähnlich. Eukaryoten als Ganzes betrachtet vereinen also beide Welten, nur die ganz ursprünglichen Archaeen stehen ein Stück weiter weg in der Verwandtschaftslinie. Auf der Ebene der Organismen wirken alle sehr verschieden; vergleicht man einen Karpfen mit einem Menschen, so findet man wenig Ähnlichkeit. Doch schon ein kurzer Blick auf die Biochemie genügt und man sieht die nahe Verwandtschaft: Alle Wirbeltiere besitzen beispielsweise Steroide als Hormone. Geht man

auf die Ebene der Zelle, so ist diese beinahe universell in ihrer Grundausstattung, auch wenn es natürlich Abweichungen gibt in Art und Anzahl der Gene und den jeweils spezifisch für die Lebensweise benötigten Strukturen.

Betrachten wir weiter die Gemeinsamkeiten: Jede Zelle besitzt eine Biomembran, die nach dem fluid-mosaik-Modell von Singer und Nicholson aus einer Lipiddoppelschicht besteht. Darin eingelassen sind große Mengen an Proteinen, die verschiedenste Funktionen erfüllen, so zum Beispiel Rezeptoren, die Signale weiterleiten, Proteine, die den Stoffaustausch zwischen Zelle und Außenwelt sowie zwischen Zelle und Organell regeln. Aus der Zellmembran ragen Kohlenhydratketten von Glykoproteinen heraus, ebenso wie Glykolipide. Eukaryotische Zellen können deutlich größer werden als ihre prokaryotischen Vetter. Der Unterschied hat eine physikalische Ursache: Die Größe einer Bakterienzelle ist durch die Diffusionsgeschwindigkeit der enthaltenen Teilchen begrenzt. Sie kann nicht beliebig größer werden, da die miteinander interagierenden Teilchen sich zu stark verdünnen würden. Die biologische Lösung heißt Kompartimentierung, also das Abtrennen einzelner Reaktionsräume innerhalb der Zelle: Organellen sind geboren. Quelle all dieser Strukturen ist der Bauplan dieser Zellen, der wiederum bei allen Zellen erstaunlich ähnlich ist. Durchgesetzt hat sich in der Evolution ein einziges Molekül, die doppelsträngige (ds) DNA, als Träger der Erbinformation. Lediglich einige Viren, die aber auch nicht mehr wirklich als Lebewesen betrachtet werden, tragen Einzelstrang-DNA oder gar RNA als Blaupause für ihren Aufbau in sich. Alle Zellen kopieren die benötigte Information aus der dsDNA in Boten-RNA (mRNA) um; die Eukaryoten sind dabei etwas raffinierter. Sie arbeiten mit komplexen Zwischenschritten und kodieren mehrere, verschiedene Genprodukte im gleichen DNA-Abschnitt.

Das Kodierungsprinzip ist aber das Gleiche bei wirklich allen Zellen, die Umschreibung der mRNA in Protein läuft nach immer dem gleichen Muster ab, mit den gleichen Hilfsmolekülen, den Ribosomen, und den Aminosäuren als Bausteinen. Unterschiede gibt es dann erst wieder bei den Eukaryoten, deren Genprodukte, die Proteine, anschließend komplexer modifiziert werden können als bei Prokaryoten, z.B. durch Anhängen von Zuckerketten. Je grundlegender die Funktion eines Genproduktes ist, desto weniger wurde es im Laufe der Evolution verändert; ein interessantes Beispiel hierfür sind die Zytochrome der Atmungskette. Häufig wird indes auch einfach die Grundstruktur eines funktionierenden Genproduktes (in der Regel ein Protein) beibehalten, das Gen wird zufällig verdoppelt, und eine Kopie erhält nach ein paar Generationen eine ähnliche oder auch ganz andere Funktion. So stellen wir uns die Entstehung ganzer Proteinfamilien vor, die wir heute kennen, von Serpinen hin zu Kernrezeptoren, Histonen, Proteasen und vielen anderen. Gemeinsam ist jedoch allen dieser Moleküle stets ein Vorfahr und sein Gen in einer Ur-Zelle, die vor langer Zeit existierte.

1993 schien das Thyroxin-bindende Globulin TBG ein unbedeutendes Molekül aus der α 1-Antitrypsin-Proteinfamilie zu sein, das aber aufgrund seiner Strukturhomologie zu „wichtigeren“ Verwandten möglicherweise Aussagen über deren Bau und Funktion liefern könnte. Wenn man sich heute ansieht, in wie viele verschiedene Regelungen Schilddrüsenhormone eingreifen, welche wichtige Rolle sie im Organismus spielen und wie

extrem hochaffin Thyroxin an TBG bindet – und damit auch T₄ zielgenau dosiert werden kann an Ort und Zelle – so ist TBG gar nicht mehr unbedeutend, sondern nur unser damaliger Blickwinkel wirkt von heute aus gesehen falsch.

2.2 Vom Gen zum Protein

Der Träger der Erbinformation ist bei allen Lebewesen doppelsträngige DNA, mit Ausnahme von manchen Viren, die einzelsträngige DNA oder RNA besitzen, jedoch als abgeleitete Lebewesen letztlich Parasiten auf Zellebene sind und daher Ausnahmen in ihrer Erscheinungsform darstellen.

Der Übersetzungsprozess der DNA in Proteine ist bei allen Organismen in etwa gleich. Da dieser Vorgang, und insbesondere die Unterschiede zwischen Pro- und Eukaryoten, für die Methodik dieser Arbeit essenziell sind, folgen zunächst kurz allgemeine Erläuterungen, bevor das TBG im Speziellen erläutert wird.

Gemeinsamer Informationsträger der Zellen ist die DNA, die aus vier verschiedenen Basen besteht. Jeweils drei Basen bilden ein Wort der Gensprache, ein Triplet oder Codon. Ein Bereich eines DNA-Abschnittes, der potenziell für ein Peptid oder ein Protein codiert, wird open reading frame (orf) genannt. Dieser ist meist definiert als der Bereich, der auf das Starttriplett ATG für Methionin (= „Start“) folgt und bis zum nächsten Stoppcodon reicht. Eine jüngere Definition legt fest, dass ein orf der Abschnitt zwischen zwei Stoppcodons ist (Sieber P. 2018).

61 der möglichen Triplets codieren proteinogene Aminosäuren, die anderen drei sind Stoppcodons. Die Umsetzung der DNA in die Primärsequenz eines Proteins ist bei Pro- und Eukaryoten gleich, auch die Codierung 1 Triplet = 1 Aminosäure ist praktisch universell.

Unterschiedlich sind Details in den Abläufen: Bei Prokaryoten wird die DNA im Zytoplasma in mRNA kopiert und dann mit Hilfe der kleineren 70S Ribosomen in Protein übersetzt. Bei Eukaryoten wird die DNA zunächst in eine Vorläufer-mRNA abgeschrieben, die preRNA. Die preRNA reift dann durch Spleißen zur eigentlichen mRNA. Hierbei werden die nicht-kodierenden Bereiche, die Introns, herausgeschnitten und aus den verbliebenen Bereichen, den sog. Exons, entsteht die mRNA (siehe Abb. 1).

Diese wird im Zytoplasma an freien oder ER-gebundenen, 80S Ribosomen in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt.

Die beteiligten Strukturen der Zellen wie tRNAs u.a. sind dabei bei den „Haustieren“ der Genetiker, den Escherichia coli-Bakterien, identisch zu den bei Eukaryoten vorhandenen. Dies bedeutet, dass man tatsächlich einfache menschliche Gene in E. coli exprimieren kann, sofern die Gensequenzen bekannt sind und die Proteine keine zu komplexe Struktur besitzen, also beispielsweise nicht posttranslational modifiziert werden oder mit Hilfe von speziellen Proteinen, den Chaperonen, gefaltet werden müssen.

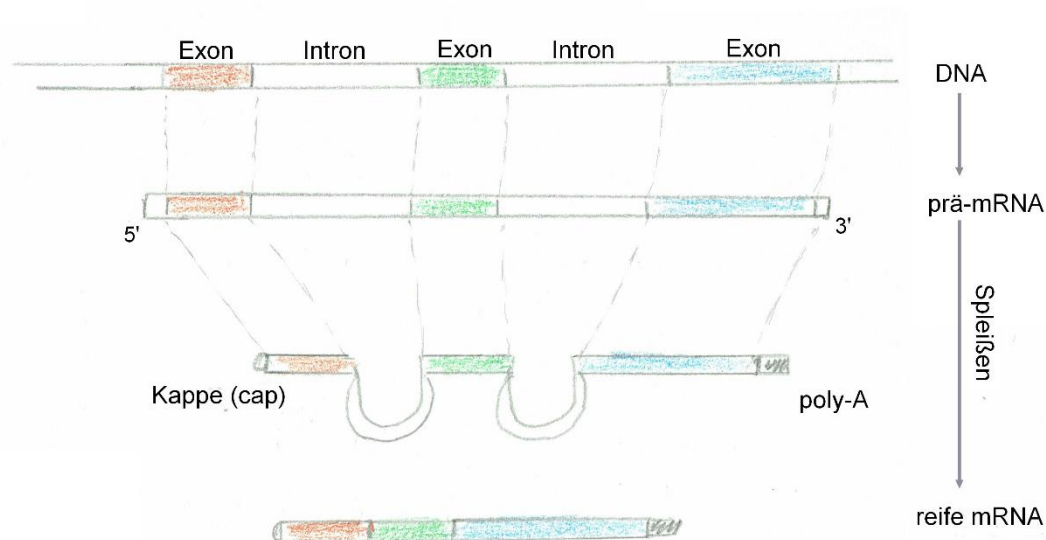


Abbildung 1 Von der DNA zur RNA bei Eukaryoten

Natürlich muss man dafür trotzdem einige ausgefeilte, technische Tricks benutzen, zum Beispiel eine cDNA-Bank (s. Kapitel 2.4) als Quelle verwenden und mit bakteriellen Plasmiden arbeiten.

Das erste so in Bakterien hergestellte Genprodukt war 1982 das Humaninsulin.

2.3 Posttranslationale Modifikationen

Eukaryotische Proteine werden jedoch sehr häufig nicht nur anders prozessiert durch den Vorgang des Spleißens, sie werden auch oft noch durch posttranslationale Modifikationen erheblich verändert. Beispiele sind Glykosylierungen durch Anhängen von Zuckerketten, Phosphorylierungen, Herausschneiden von Proteinanteilen aus dem Precursor-Protein (Proinsulin – Insulin), Umbau zu Lipoproteinen und vieles mehr; insgesamt sind über 300 verschiedene Modifikationsmöglichkeiten bekannt. Diese Modifikationen finden jedoch bei Prokaryoten so nicht bzw. nicht im gewünschten Umfang statt, daher können eukaryotische Gene meistens nicht in Prokaryoten exprimiert werden. Diese Genprodukte wären auch chemisch und sterisch nicht identisch mit jenen aus eukaryotischen Zellen, da Prokaryoten insbesondere die typisch eukaryotische, posttranslationale Modifikation nicht durchführen (Dey 2016). Die meisten dieser Produkte wären daher normalerweise nutzlos.

Prokaryoten besitzen zwar grundsätzlich ebenfalls Glykoproteine, doch diese sind anders aufgebaut und nicht mit denen von Eukaryoten vergleichbar (Dey 2016).

Bakterien sind jedoch sehr nützliche Organismen, um im Labor große Mengen an DNA mit dem gewünschten Gen zu produzieren, da sie schnell wachsen und zusätzliche, ringförmige DNA-Moleküle tragen, sog. Plasmide. In diese kann man beliebige Gene klonieren, die dann unter entsprechendem Selektionsdruck wie dem Zusatz einer Antibiotikaresistenz auch an

neue Bakterien weitervererbt werden. Plasmid-gebundene Gene lassen sich auch sehr einfach mutieren, zum Beispiel für gezielte Mutageneseexperimente.

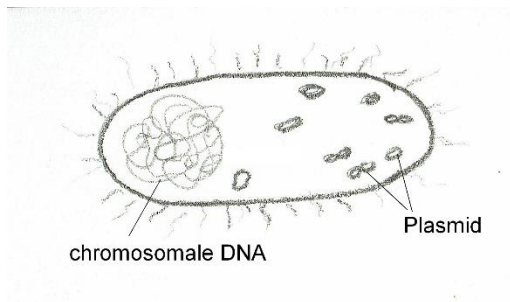


Abbildung 2 *E. coli* - Bakterium

Will man aus der Plasmid-DNA das Fremdgen exprimieren, so ist eine Möglichkeit, *in vitro* mRNA herzustellen und diese dann in eukaryotische Zellsysteme zu verbringen. Zwei dieser Systeme wurden hier verwendet: das Retikulozytenlysat, das ein eukaryotisches Zellsystem ohne vollständige Kompartimentierung darstellt und somit immer ein Produkt aus einer mRNA generiert, sofern diese ein funktionsfähiges Leseraster codiert. Die andere Möglichkeit ist die Injektion der mRNA in reife Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis*, die das gewünschte Protein produzieren und, bei sekretorischen Proteinen, auch ins Medium sezernieren.

Mittlerweile wurden auch eukaryotische Expressionssysteme entwickelt wie z.B. in Hefe (Hamilton 2003), Tabak, Säugetier oder Insektenzellen, die teilweise andere Nachteile haben wie z.B. ungünstige oder giftige Nebenprodukte.

Epigenetische Effekte können bei diesen Systemen bislang nicht spezifisch erfasst werden.

2.4 Expression des gesuchten Gens

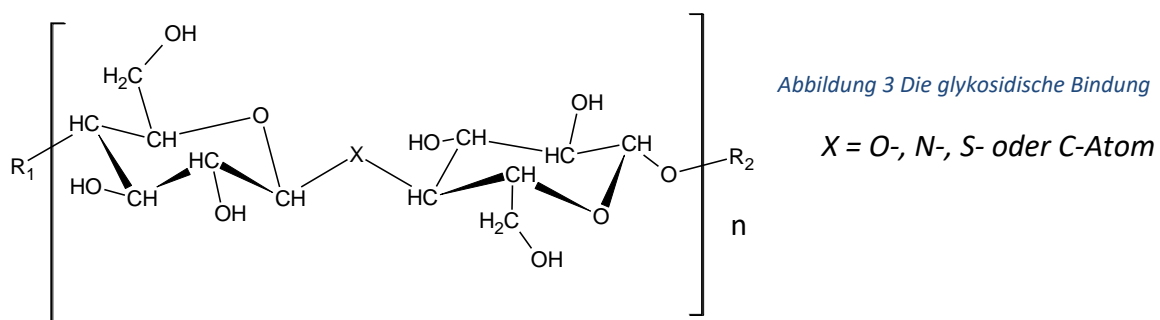
Aufgrund der komplexen, zellulären Prozesse von der DNA bis zur Proteinsequenz ist es nicht möglich, einfach einen beliebigen Genabschnitt des mittlerweile vollständig sequenzierten, menschlichen Genoms in ein Protein zu übersetzen, geschweige denn in ein Bakterium zu klonieren oder anderweitig zu erforschen. Daher wählt man einen anderen Weg: man verwendet die cDNA-Bank einer Zelle, in diesem Fall der Schilddrüse.

Die chromosomale DNA ist in nahezu jeder Körperzelle gleich, aber jeweils nur ein bestimmtes Set von Genen ist, je nach Zelltyp, aktiv. Eine cDNA-Bank ist im Prinzip die künstliche Um-Schreibung der kompletten mRNA einer bestimmten Zelle oder eines Gewebes in DNA. Sie beinhaltet alle Gene, die zum Zeitpunkt der Extraktion in diesen Zellen aktiv sind und abgeschrieben werden, das Transkriptom.

Eine cDNA-Bank ist sozusagen ein Schnappschuss der gesamten Genaktivität einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem bestimmten Gewebe. Diese cDNA wird in bakterielle Plasmide transformiert, ist dort lagerfähig und beliebig gentechnisch weiterverwendbar. Die Suche nach dem richtigen Klon, der das gewünschte Gen dann auch tatsächlich enthält, kann allerdings Jahre dauern.

2.5 Glykoproteine

Die wichtigste und häufigste posttranslationale Modifikation von Proteinen ist die Glykosylierung der Primärstruktur; man spricht dann von Glykoproteinen. Glykane (Synonym für Polysaccharide (<http://goldbook.iupac.org> 2020)) sind die ubiquitär vorkommenden Moleküle des Lebens. Es sind Kohlenhydrate, in denen eine große Anzahl von Monosacchariden über eine glykosidische Bindung miteinander verbunden sind. Eine glykosidische Bindung ist die chemische Verknüpfung zwischen einem Zuckermolekül und einem weiteren Zuckermolekül oder auch einem anderen Molekül, das kein Kohlenhydrat ist (= ein Aglycan). Solche Verbindungen sind weit verbreitet und werden allgemein als Glykoside bezeichnet. Das mengenmäßig bedeutendste Glykosid ist die Cellulose, die aus β -1,4-glykosidisch verbundenen Glucosemonomeren in unverzweigter Kette aufgebaut ist.



Nukleinsäuren sind die universellen Informationsspeicher der Zellen und dienen als Kopiervorlagen für den Bau von Proteinen. Proteine sind Bestandteile praktisch aller lebenden Zellen und haben aufgrund ihrer Strukturvielfalt an nahezu allen Lebensprozessen wesentlichen Anteil. Oligosaccharide werden in der Natur verwendet, um spezifisch die Eigenschaften von Biomolekülen zu modifizieren, insbesondere auch von Proteingrundgerüsten; sie kommen bei allen Lebewesen vor, bei Eukaryoten, Prokaryoten und Archaeen. Außerdem sind Oligosaccharide die Basis für die Kommunikation zwischen Proteinen und Zellen.

Lösliche Bestandteile des Blutplasmas sind in der Regel glykosylierte Proteine, ebenso wie sezernierte Schleimproteine und die Proteine, die in der Plasmamembran von Zellen eingelagert sind.

Das erste beschriebene Glykoprotein war ein Hämoglobin (Kunkel 1955). Bis auf wenige Ausnahmen, zu denen insbesondere das Albumin gehört, sind praktisch alle Plasmaproteine glykosyliert (Karlson 2005), darunter auch die Immunglobuline IgA, IgG und IgM, das Antithrombin-III, und α -1 Antitrypsin und viele mehr (Cobb 2020). Der Kohlenhydratanteil schwankt zwischen 10 bis 25% (Karlson 2005).

Die häufigsten Modifikationen von Biomolekülen durch Polysaccharide sind die N-, die O-Glykosylierung von Proteinen und die GPI-Anker (Glycosylphosphatidylinositol-Anker). GPI-Anker befestigen in allen eukaryotischen Zellen Glykoproteine an der Zelloberfläche in der Außenseite der Plasmamembran (Flury 2001).

Bei N- und O-Glykosylierungen werden Zuckerketten an das naszierende Protein geheftet. Meistens sind nur einige Oligosaccharidketten an das Aminosäurerückgrat von Plasmaproteinen gebunden. Die Oligosaccharide selbst sind relativ komplex und bestehen aus 10 bis 15 Monosacchariden in einer verzweigten Kette. Die häufigsten Monosaccharide, die hier vorkommen, sind Mannose, Galactose, Fructose, N-Acetyl-Glucosamin, Fucose und Sialinsäure (Karlson 2005).

Die Glykosylierungen haben vielfältige Funktionen im Organismus wie Rezeptorinteraktionen, bei der Immunantwort sowie für Proteinsekretion und Transport. Der Zuckeranteil verändert die physikalischen Eigenschaften des Proteins wie die Löslichkeit, die Stabilität und die Faltung und hat daher eine immense Bedeutung für das gesamte Molekül (Clerc 2015).

Ein Protein kann mehrere Glykosylierungsstellen besitzen und somit in unterschiedlichen Glykoformen vorkommen. Diese Formen unterscheiden sich in Bezug auf die tatsächliche Benutzung der potenziell vorhandenen Glykosylierungsstellen (Makroheterogenität) und in Bezug auf die Saccharidteile in den Ketten (Mikroheterogenität).

Die Biosynthese, die zu dieser Vielfalt an Glykoformen führt, hängt offenbar von mehreren Parametern ab und kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, darunter genetische Regulationsmechanismen, von der Verfügbarkeit der Nukleotidzucker, der Verweildauer des naszierenden Proteins in ER und Golgiapparat und der sterischen Zugänglichkeit der Glykosylierungsstelle (Cobb 2020).

Das Glykosylierungsmuster der Proteine kann sich zwischen mehreren Individuen unterscheiden, ist aber bei einer Person bemerkenswert stabil und ändert sich nur merklich, wenn die Homöostase einer Person sich ändert durch einen geänderten Lebensstil oder pathologisch relevante Umstände. Aus Studien mit tausenden von Probanden weiß man, dass die Glykosylierung mit dem Alter, dem Geschlecht und dem Lebensstil korreliert. So hängt etwa die Stärke der Galaktosylierung und Sialierung von IgG beispielweise direkt mit dem Lebensalter zusammen. Während einer Schwangerschaft ist eine deutlich erhöhte Galaktosylierung und Sialierung vieler Proteine und eine signifikant verlängerte Halbwertszeit dieser Proteine messbar. Gleichzeitig sind Änderungen der Glykosylierung bei vielen Krankheiten und Entzündungsreaktionen nachzuweisen. Manche Glykoformen sind auch das Ziel viraler oder bakterieller Angriffe, oder dienen dem Immunsystem als pro- oder antiinflammatorisches Signal (Cobb 2020).

Glykosylierungen spielen eine wichtige Rolle bei der Reifung von Proteinen. N-glykosidisch gebundene Glykane besitzen eine komplexe, oligomere Struktur, die eine Art präziser Vorlage darstellt für die Substrate, die die Proteine in ihre Tertiärstruktur falten, und für die Systeme, die dies qualitativ prüfen und überwachen (Xu and Ng 2015). Insbesondere scheinen die frühen Schritte der N-Glykosylierung sehr wichtig zu sein für die Qualitätskontrolle der Proteinreifung: Hierbei werden drei Glucosemoleküle und einige spezifische Mannosen im ER entfernt (Roth 2010). Aus den Untersuchungen genetisch bedingter Erkrankungen weiß man, dass einige davon durch falsch gefaltete Proteine verursacht werden, die sich dadurch im endoplasmatischen Retikulum der Zellen anhäufen.

Für den Mangel an α -1-Antitrypsin, die zystische Fibrose und den Mangel an Faktor V und VIII ist dies bereits nachgewiesen worden (Ferris 2014).

Falsch gefaltete sekretorische oder membranständige Proteine werden im ER zurückgehalten oder abgebaut durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Ferris 2014). Der hierfür zuständige Mechanismus im Zellapparat wird ERQC genannt (ER-Qualitätskontrolle) (Marquardt 1992) (Araki K 2011). ERQC sorgt dafür, dass keine falsch gefalteten Proteine das ER verlassen; sie können in jeder Phase ihrer Entstehung aussortiert werden: während des kotranslationalen Stoffaustausches, post-translationaler Modifikationen, bei Chaperon-gestützten Faltungsprozessen, beim Zusammenbau der Quartärstruktur aus mehreren Untereinheiten, beim Weitertransport innerhalb der Zelle und beim Export aus der Zelle (Ferris 2014).

Glykoproteine werden durch ihre Kohlenhydratketten auch thermodynamisch stabilisiert (Shental-Bechor 2008) und die Entfaltung wird verhindert, die zu einer Dysfunktionalität des Moleküls führen würde (Higel 2016). Die Halbwertszeit im Blut wird durch die N-Glykosylierung deutlich verlängert, was am Beispiel des Wachstumshormons nachgewiesen wurde (Flintegaard 2010) und der IgG-Moleküle (Higel 2016).



Für die Glykosylierung von Proteinen gibt es chemisch sehr unterschiedliche Möglichkeiten: Die N-Glykosylierung, die O-Glykosylierung, die C-Glykosylierung, die S-Glykosylierung und die Glykation (uniprot.org 2020). Grundvoraussetzung für die N-, O- und C-Glykosylierung ist immer das Vorhandensein einer spezifischen Erkennungssequenz (consensus sequence) in der Aminosäurekette.

Die **O-glykosidische** Bindung einer Zuckerkette an die Hydroxygruppe eines Threonins oder eines Serins, seltener an Hydroxyprolin oder Hydroxylysin, findet im Golgiapparat statt. Sie ist, ebenso wie die N-Glykosylierung, schon länger bekannt (Karlson 2005). Manchmal wird auch nur ein einziger Zuckerrest angehängt wie bei o-glykosidisch gebundenen N-Acetylglucosamin (Larkin 2011). O-glykosylierte Proteine spielen eine wichtige Rolle beim Transport von Proteinen an ihre Zielorte und Ändern die Löslichkeit von Proteinen. Sie wirken als Antigene und sind wichtig für Zell-Zell-Interaktionen. Ein Beispiel ist das

Blutgruppenantigen Glycophorin-A (uniprot.org 2020).

Erst vor kurzem wurde die **S-Glykosylierung** in menschlichen und bakteriellen Proteinen entdeckt (Maynard 2016). Hierbei wird das Oligosaccharid an das Schwefelatom eines Cysteins gekoppelt; nachgewiesen wurde dies z.B. beim *Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1* (uniprot.org 2020).

Bei der **C-Glykosylierung** wird eine Mannose an ein Tryptophan eines extrazellulären Proteins gekoppelt. Chemische Analysen lassen vermuten, dass hierbei ein Hexoserest direkt an den Indolring des Tryptophans gekoppelt wird (Hofsteenge 1994).

Die Erkennungssequenz hierfür ist noch nicht klar; entweder W-X-X-W oder W-S/T-X-C.

[W Tryptophan, X beliebig; S Serin, T Threonin, C Cystein]

Ein untersuchtes Beispiel ist die Komponente 6 des Komplementsystems (uniprot.org 2020).

Unter der **Glykation** versteht man eine nicht-enzymatische Anheftung reduzierender Zucker an das Stickstoffatom einer Aminosäure am N-Terminus der Peptidkette, und zwar an Lysin- oder Histidin-Reste. Diese Modifikation nennt man auch *in vivo Maillard Reaktion* (Tessier 2009).

Bei der **N-Glykosylierung** wird eine N-glykosidische Bindung an den Amidstickstoff eines Asparaginrestes im endoplasmatischen Retikulum (ER) geschlossen. Sie kommt bei sezernierten oder membranständigen Proteinen vor, hauptsächlich bei Archaeen und Eukaryoten (uniprot.org 2020).

Für eine posttranslationale N-Glykosylierung muss die Aminosäuresequenz Asn – X – Ser/Thr in der Primärstruktur des Proteins vorhanden sein. [Asn: Asparagin; X: beliebige Aminosäure außer Prolin; Ser: Serin; Thr: Threonin]. In der Regel wird dann das Asparagin glykosyliert. Die Kopplung an eine Erkennungssequenz mit Threonin kommt wesentlich häufiger vor als die an eine Serin-haltige Sequenz (uniprot.org 2020).

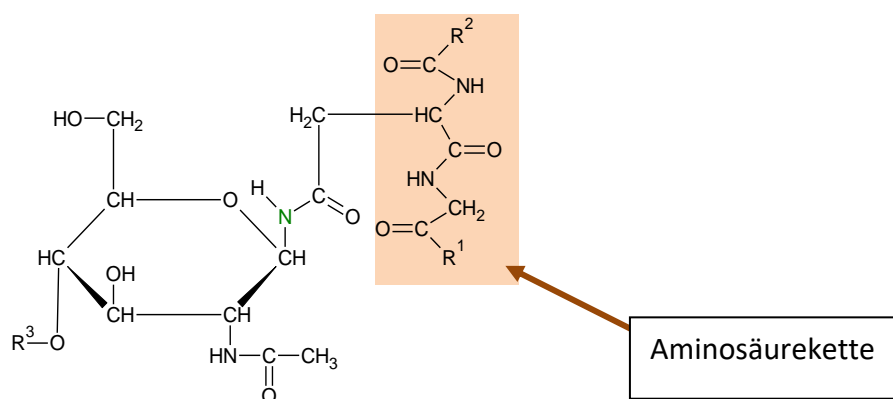


Abbildung 5 Eine N-glykosidische Bindung

(nach (Karlson 2005)). R₃ ist die Glykankette, R₁ und R₂ die Proteinreste

Die N-Glykosylierung von Proteinen erfolgt in zwei Schritten.

Zuerst wird im ER ein Glykanmolekül zusammengesetzt, das anschließend an eine wachsende Peptidkette geknüpft wird. Im ersten Schritt werden Ketten von 14 Zuckerresten,

bestehend aus zwei N-Acetylglucosaminresten, neun Mannoseresten und drei Glucoseresten, an ein im endoplasmatischen Retikulum vorkommendes, membranständiges Lipid geheftet, das Dolicholphosphat (Dol-P), das bei allen Eukaryoten gleich aufgebaut ist (Larkin 2011) (Ferris 2014).

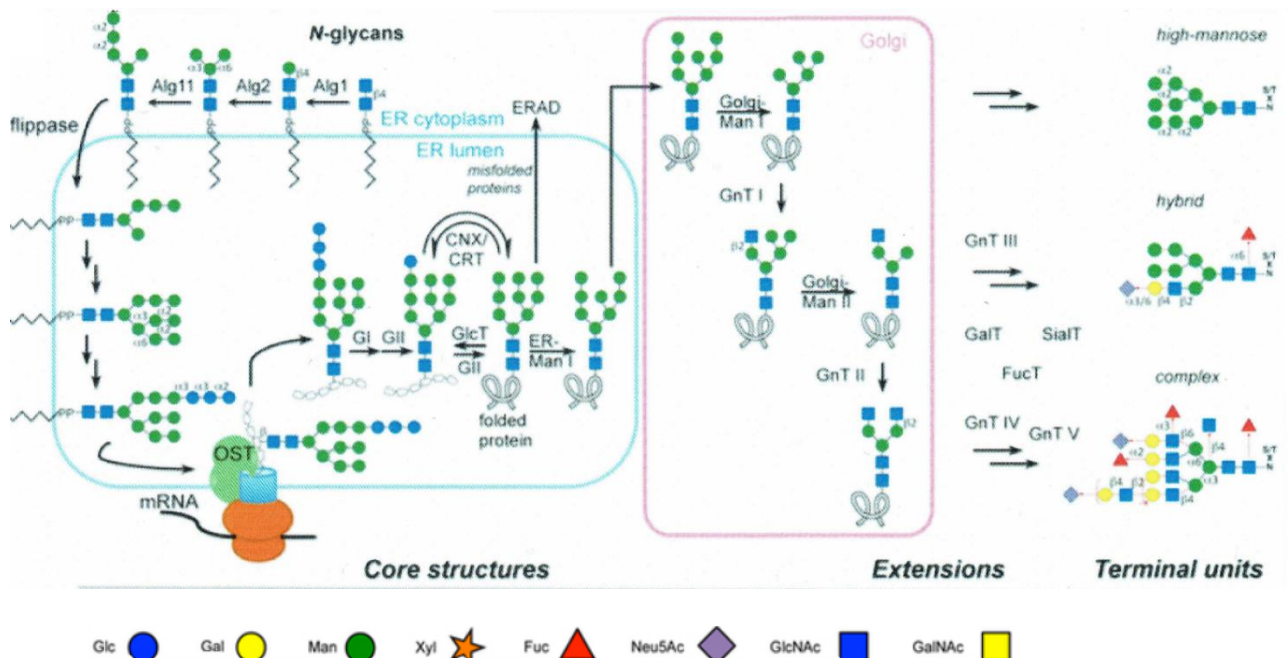


Abbildung 6 Entstehung der N-glykosidischen Modifikationen

Index zur Abb.: (Krasnova 2019); Glc Glucose, Gal Galactose, Man Mannose, Xyl Xylose, Fuc Fucose, Neu5Ac N-Acetylneuraminsäure, GlcNAc N-Acetylglucosamin, GalNAc N-Acetylgalactosamin

Eine ganze Reihe von Glycosyltransferasen baut schrittweise ein triantennäres Kern-Oligosaccharid zusammen, das dann an ein geeignetes Polypeptid transferiert wird. Dann werden drei Glucosemoleküle und ein Molekül Mannose entfernt und die Glykane im Golgiapparat weiter modifiziert in der sogenannten „terminalen Glykosylierung“ (uniprot.org 2020). Die ausgeprägten Unterschiede in den Glykostrukturen reifer Proteine in den verschiedenen Organismen und Organen entstehen erst in nachfolgenden Modifikationsschritten der Zuckerreste (Larkin 2011).

Es gibt drei verschiedene Typen von N-Glykanen in reifen Proteinen (Abb. nach (Krasnova 2019)):

- Mannosereiche Glykane,
- hybride und
- komplexe Glykane.

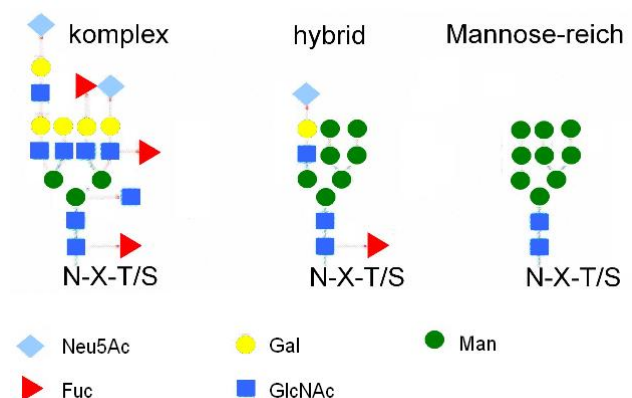


Abbildung 7 Glykanstrukturen in N-glykosidischen Glykoproteinen

Die N-glykosidischen Proteine sind in dieser Arbeit besonders von Bedeutung, da das TBG ein Glykoprotein mit fünf solcher (potenziellen) Bindungsstellen in der Primärstruktur ist.

2.6 Informationsübertragung in höheren Wirbeltieren

1905 wurde zum ersten Mal der Terminus „Hormon“ verwendet durch den britischen Physiologen Ernest H. Starling. Bereits 1914 gelang es dem Biochemiker Edward C. Kendall, Thyroxin-Kristalle zu isolieren; später erhielt er für die Entdeckungen der Hormone der Nebennierenrinde den Nobelpreis (Kleine und Rossmanith 2007). Seither hat sich unser Verständnis der Zusammenhänge im Hormonsystem des menschlichen Körpers rapide verdichtet. Dennoch bleiben immer noch Fragen offen, die beantwortet werden müssen. Komplexe, vielzellige Organismen wie Tiere benötigen sichere Wege der Kommunikation, um die Aktivität der einzelnen Zellen exakt zu steuern und zu kontrollieren. Schlägt dies fehlt, führt dies zu Krankheiten und oft zum Tode des Organismus, wie z.B. bei Autoimmunerkrankungen oder bei Krebs.

Wir kennen, grundsätzlich betrachtet, drei verschiedene Systeme, durch die prinzipiell Information in tierischen Organismen vermittelt wird: die schnelle elektrisch-chemische Informationsübermittlung im Nervensystem, die wesentlich weiter reichenden und weit länger wirkenden Hormone, sowie das Immunsystem, das mittels humoraler und zellulärer Reaktionsmechanismen ebenfalls über Botenstoffe wirkt. Alle drei Systeme sind miteinander verwoben; besonders eng verknüpft sind Hormon- und Nervensystem, wie man an der Schilddrüse gut sehen kann: Die Ausschüttung von Neuropeptiden des Hypothalamus führen zur Hormonfreisetzung in der Hypophyse, so z.B. führt TRH zur Ausschüttung von Thyreotropin, was wiederum zur Ausschüttung der Schilddrüsenhormone T_3/T_4 führt, weswegen man hier von der hypothalamisch-hypophysären-thyroidalen Achse spricht (Kleine und Rossmanith 2007).

2.7 Die Schilddrüse (Glandula Thyroidea)

2.7.1 Anatomie

Die bei allen Wirbeltieren vorkommende Schilddrüse (Glandula thyroidea) ist beim Menschen eine schmetterlingsförmige Hormondrüse, die aus zwei größeren Seitenlappen und einem schmaleren Mittellappen besteht und von einer Kapsel umgeben ist. Sie ist auf der Luftröhre verschiebbar und umschließt diese unterhalb des Kehlkopfes (Vaupel 2015). Das Drüsengewebe besteht aus Follikeln, die unregelmäßig gestaltet sind und von einem einschichtigen Epithel umschlossen sind. Das Kolloid im Inneren der Follikel enthält die Schilddrüsenhormone in ihrer Vorläuferform, dem Thyreoglobulin, das ein besonders Tyrosin-reiches Protein ist.

2.7.2 Funktion der Schilddrüse

Die hypophysäre Sekretion des schilddrüsenstimulierenden Hormons TSH wird vorrangig durch das thyrotropin releasing hormone TRH (Thyrotropin freisetzendes Hormon) des

Hypothalamus gesteuert (Klinke und Silbernagl 2005); hierfür ist der Nucleus paraventricularis zuständig (Kleine und Rossmanith 2007). Die neuroendokrine Regulation ist schwächer ausgeprägt als bei anderen endokrinen Drüsen (Klinke und Silbernagl 2005).

An der Bildung und der Speicherung des Thyreoglobulins sind sowohl das Epithel wie auch das Kolloid der Schilddrüse beteiligt (Vaupel 2015).

Die Schilddrüse produziert die Schilddrüsenhormone, indem Iodidionen unter Energieverbrauch über eine Natrium⁺/Iod⁻-Pumpe an der Basalmembran der Zellen aktiv in die Epithelzellen aufgenommen werden (Song 2007). Das Iodid wird ca. 25-fach angereichert (Klinke und Silbernagl 2005). Das Iodid diffundiert aus der Zelle in Richtung Kolloid durch einen Iodidkanal aufgrund des vorhandenen Konzentrationsgradienten.

Im Kolloid wird das Iodid oxidiert und mit Hilfe des membranständigen Enzyms Thyreoperoxidase (TPO) an Tyrosin bzw. 3-Iodtyrosin gekoppelt unter Substitution je eines Wasserstoffatoms an einem der Phenylringe (Song 2007).

Schüttet die Hypophyse das Schilddrüse-stimulierende Hormon TSH aus, so werden in den Follikeln der Schilddrüse Thyreoglobulinmoleküle abgebaut durch Aufnahme des Thyreoglobulins in die Epithelzellen, wo dieses abgebaut wird und anschließend in die Blutbahn sezerniert und somit im ganzen Körper verteilt wird (Vaupel 2015).

Hierbei entsteht durch den gleichen Mechanismus auch H₂O₂ in der Zelle, das zur Vermeidung von Zellschäden entgiftet werden muss. Ist Iodid in hohen Konzentrationen vorhanden, so entsteht allerdings kein Peroxid (Song 2007).

Die Schilddrüse selbst produziert überdies ein weiteres Hormon, das Kalzitinin, das die Kalziumregulation im Körper beeinflusst (Vaupel 2015).

Die Nebenschilddrüse besteht aus vier kleinen Drüsen, die auf der Rückseite der eigentlichen Schilddrüse liegen. Sie ist für die Synthese und die Freisetzung von Parathormon zuständig, das zusammen mit Kalzitinin und Vitamin D₃ den Kalziumstoffwechsel reguliert (Kleine und Rossmanith 2007).

2.7.3 Wirkungsweise der Schilddrüsenhormone

Triiodthyronin beschleunigt vor allem oxidative Stoffwechselprozesse in den meisten Zelltypen des Körpers. Der Energieumsatz des ganzen Organismus wird gesteigert, der Sauerstoffverbrauch wird erhöht durch einen gesteigerten Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel. Die Proteinbildung und die Synthese von Ribonukleinsäure wird durch T₃ gesteigert. Bei Kindern fördern die Schilddrüsenhormone die Entwicklung des Gehirns und das körperliche Wachstum (Vaupel 2015).

2.7.4 Störungen der Schilddrüsenfunktion

Eine Vermehrung der Follikelzahl führt zu einer Vergrößerung der Schilddrüse, einem sog. Struma. Follikelgruppen können ihre Funktion ändern, es können sich Nekrosen und Verkalkungen bilden. Man kann in der Diagnostik aber nicht zwangsläufig vom Kropf auf die Funktion der Schilddrüse schließen, da dieser bei normaler Funktion, bei Über- oder bei Unterfunktion vorkommen kann.

Eine Hypothyreose ist eine Schilddrüsenunterfunktion, wobei Angebot oder Wirkung von Schilddrüsenhormonen ungenügend sind. Tritt diese insbesondere in der Kindheit bereits auf und wird nicht behandelt, so können gravierende Entwicklungsverzögerungen und -schäden folgen.

Bei einer Hyperthyreose ist eine gesteigerte Ausschüttung von T_3 und T_4 festzustellen, die u.a. zu einem erhöhten Grundstoffwechsel, erhöhter Körpertemperatur sowie erhöhter Herzfrequenz und gesteigerter Erregbarkeit führen. Eine Hyperthyreose kann immunogen oder nicht-immunogen bedingt sein (Vaupel 2015).

Umwelttoxikologische Studien ergaben im Tierversuch eine Beeinflussung des Schilddrüsenpiegels an T_3 und T_4 durch PCB (polychlorierte Biphenyle) in nennenswertem Umfang, vermutlich durch Konkurrenz an Bindeproteinen (Van den Berg 1991). Eine Korrelation zu humanen Schilddrüsenhormonen ist zu erwarten. Insgesamt haben die Schilddrüsenhormone so weitreichende systemische Auswirkungen, dass eine Dysbalance immer zu Problemen führt und eine korrekte Einstellung aus medizinischen Gründen, aber auch für das Wohlbefinden der Patienten unbedingt notwendig ist.

2.7.5 Schilddrüsenhormone

Es gibt drei Gruppen von menschlichen Hormonen, die man nach ihrer Biochemie einteilt: Protein- bzw. Peptidhormone, Steroid-Hormone und Aminosäurederivate. Die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 gehören zu letzterer Gruppe.

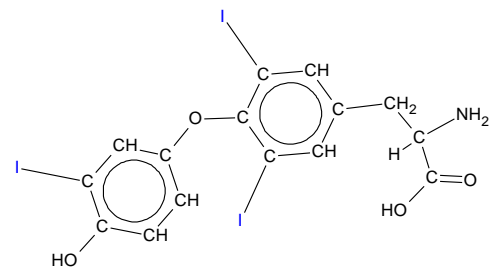


Abbildung 8 T_3

Sie werden, wie bereits erwähnt, aus der Aminosäure

Tyrosin gebildet, die ihrerseits aus der essenziellen Aminosäure Phenylalanin hergestellt wird durch enzymatische Hydroxylierung des Phenylrings (Lehninger 1987).

Thyroxin wird auch als T_4 bezeichnet und heißt vollständig 3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin.

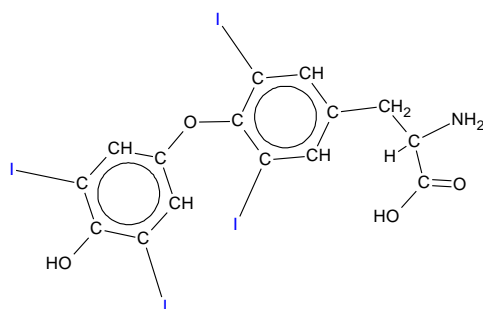


Abbildung 9 T_4

T_4 und das daraus gebildete T_3 (Tri-Iodthyronin) sind essenziell für den Energiestoffwechsel des menschlichen Körpers. Sie stimulieren den Grundumsatz des Körpers; ein T_3 -Mangel kann letal sein (Kleine und Rossmann 2007). Ein Exzess oder der Ausfall des Thyroxin-bindenden Globulins kann ebenfalls zu Stoffwechselstörungen führen.

Die Schilddrüse sezerniert täglich ca. 90 μg T_4 und 8 μg T_3 . Im Blut ist Thyroxin nahezu vollständig gebunden, dabei zu 60 % an TBG (Thyroxin-bindendes Globulin), 30% an TBPA (Thyroxin-bindendes Präalbumin) und zu 10% an Albumin. Freies T_3 liegt im Blut etwa 10x so

konzentriert vor wie T_4 . Die Plasmahalbwertszeit von T_4 liegt bei 7 Tagen, von T_3 bei 1 bis 2 Tagen (Vaupel 2015).

Die aktuelle Schilddrüsenfunktion wird durch die Bestimmung der Konzentrationen an freien Schilddrüsenhormonen dargestellt, die etwa 0,03% des Gesamt- T_4 und 0,3% des Gesamt- T_3 im Serum ausmachen (Ziegler 1993).

2.7.6 Die Deiodasen

Das eigentlich wirksame Hormon im Körper ist das T_3 . Es wird mittels Deiodasen von T_4 zu T_3 umgebaut.

Deiodasen, im englischen Sprachraum Deiodinasen, sind Selen-Enzyme mit einer Selenocysteingruppe, von denen es drei bislang bekannte Typen gibt. Sie spalten Iodatome vom Thyroxin ab und erzeugen so Triiodthyronin, das deutlich stärker an den Schilddrüsenhormon-Rezeptor bindet als das Thyroxin (Kleine und Rossmanith 2007) und das 3,3'- T_2 (Gereben 2009).

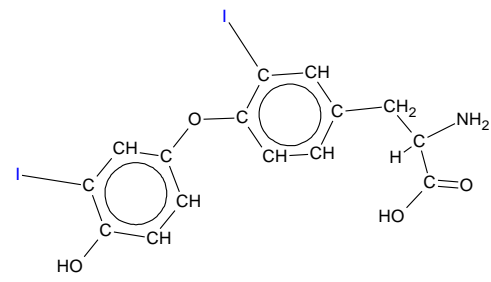


Abbildung 10 3,3'- T_2

Die drei Iodothyronin-Deiodasen unterteilen sich in zwei aktivierende 5'-Deiodasen (D1 und D2) und eine inaktivierende 5-Deiodase (D3).

D2 und D3 verändern die lokale Konzentration an aktivem Schilddrüsenhormon T_3 durch gewebespezifische und zeitabhängige Aktivität. Dadurch spielen sie eine sehr viel größere Rolle bei der Regulierung der Wirkung der Schilddrüsenhormone in den Effektororganen als bisher angenommen, und zwar relativ unabhängig vom Serumspiegel der Hormone (Gereben 2009). Einige dieser Deiodasen sind, wie bereits erwähnt, in der Zellmembran vorhanden: Aus Studien mit Zellmodellen geht hervor, dass die Deiodasen D1 und D3 in der Plasmamembran lokalisiert sind, D2 dagegen im endoplasmatischen Retikulum (Prabakaran 1999) (Gereben 2009). Besonders wichtig erscheint hierbei die D2, die offensichtlich dauerhaft im ER lokalisiert ist. Dort kann das durch D2 katalytisch produzierte T_3 , aufgrund der relativen räumlichen Nähe des ER zum Zellkern, schnell sein Zielgen in der Kern-DNA erreichen (Gereben 2009).

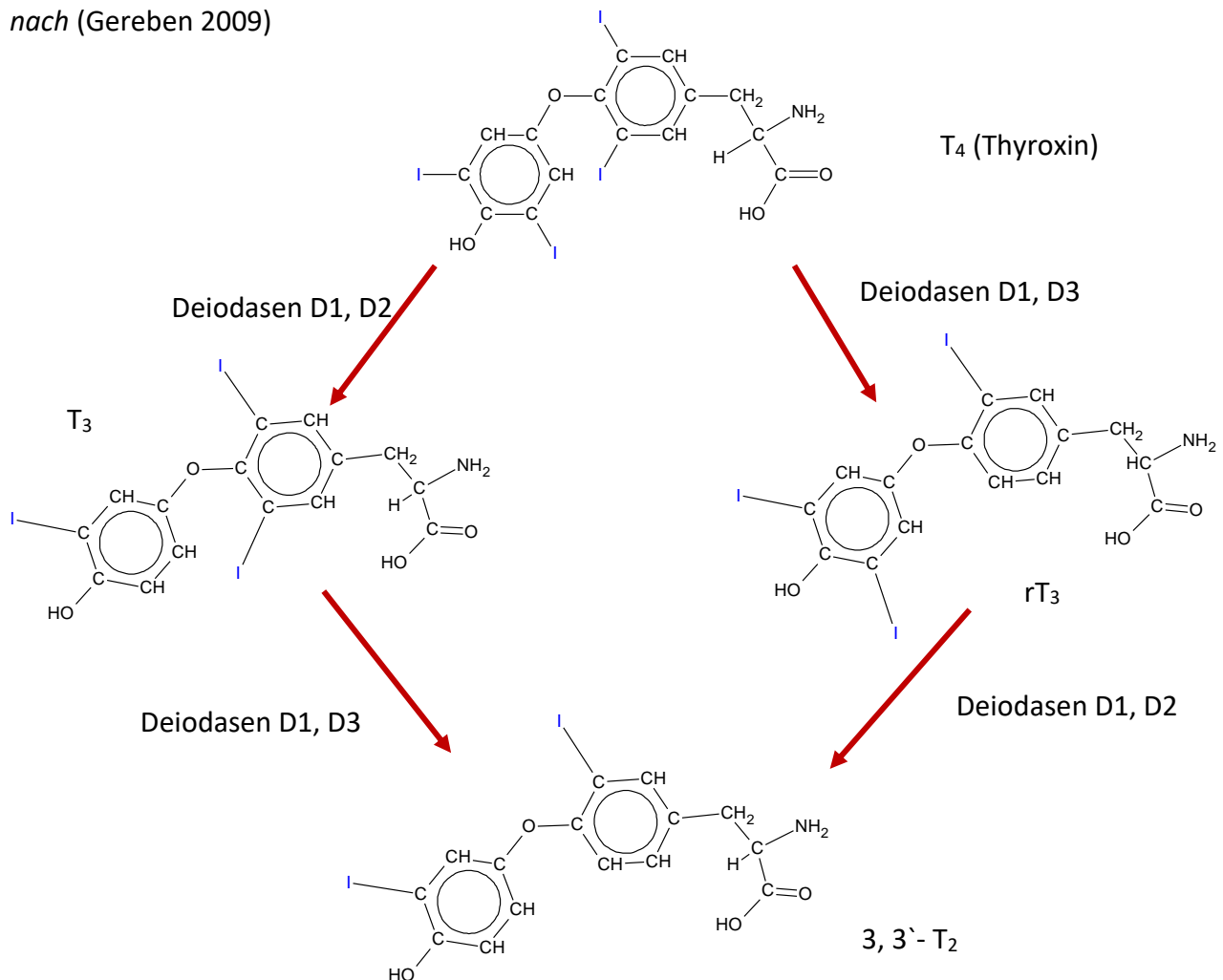
Untersuchungen an Gehirnzellen lassen dort wiederum einen stereospezifischen Transportmechanismus für Schilddrüsenhormone vermuten, da in Gliazellen die Deiodase D2 exprimiert wird, Gliazellen selbst aber wiederum nicht das Endziel von T_3 sind, sondern die Neuronen. Dieses Transportsystem würde zu einer höheren Konzentration von T_3 innerhalb des Zellkerns gegenüber der Zytoplasmakonzentration führen als bislang angenommen wurde (Gereben 2009).

Die Deiodasen sind offensichtlich weitere Stellschrauben, an denen der Organismus gezielt die Wirkung der Schilddrüsenhormone modulieren kann u.a. während der Entwicklung und Metamorphose von Vertebraten, bei Verletzungen, Heilungsprozessen, bei der Funktion des

Hypothalamus und bei der homöostatischen Steuerung des Energiehaushalts (Gereben 2009).

Abbildung 11 Umwandlungen der Schilddrüsenhormone durch Deiodasen

nach (Gereben 2009)



2.7.7 Wirkorte von Schilddrüsenhormonen

Hormonrezeptoren unterteilen sich in zwei Klassen, in G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren und zytosolische Rezeptoren für Steroide und Schilddrüsenhormone. Die membranständigen Rezeptoren vermitteln schnelle Reaktionen, die dann innerhalb der Zelle in länger wirksame Reaktionen verwandelt werden können (Kleine und Rossmann 2007).

Die spezifische Wirkung von Schilddrüsenhormonen hängt ab vom Zelltyp, vom exprimierten Rezeptortyp und vom Hormon selbst (Davis 2019). Zellen reagieren nur dann auf Hormone, wenn sie auch den zugehörigen Rezeptor besitzen (Kleine und Rossmann 2007); dies ist das Prinzip der Wirksamkeit oder Schlüssel-Schloss-Prinzip.

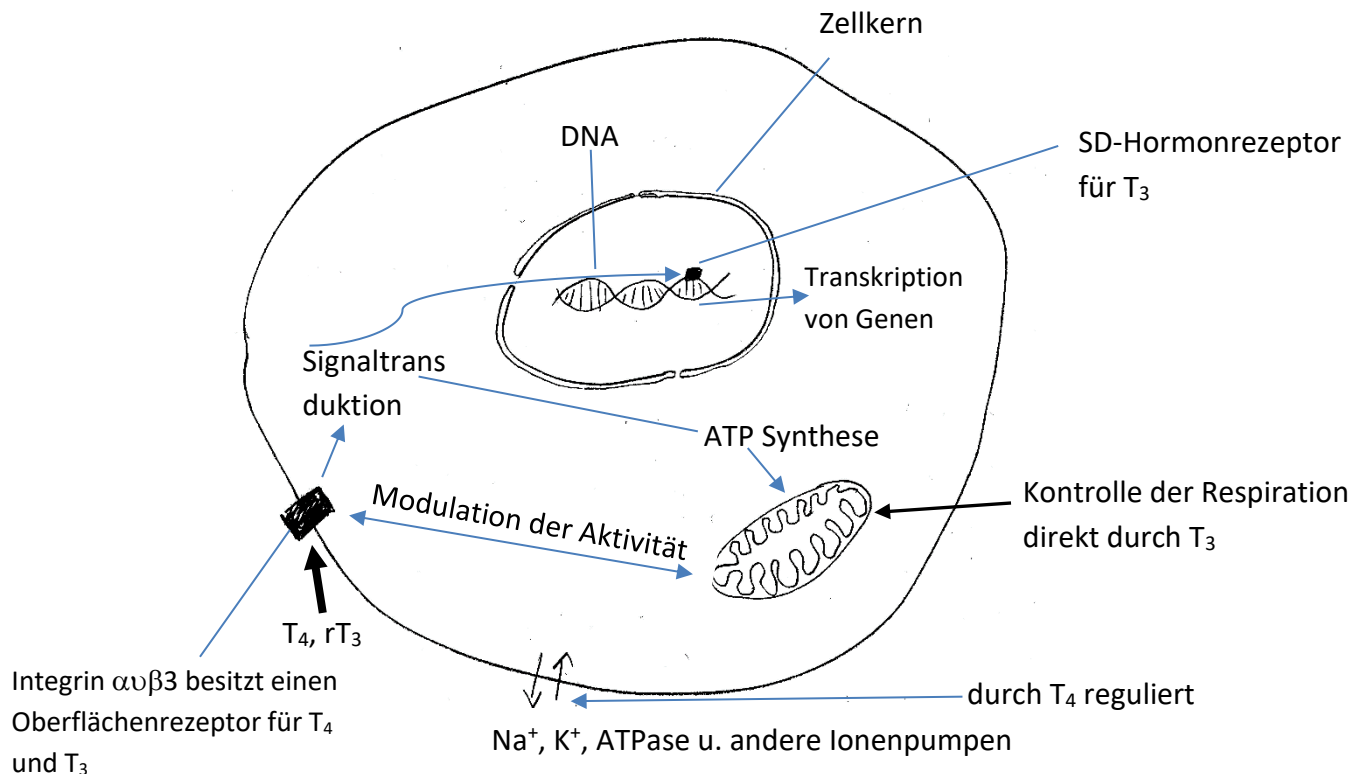
Die Wirkungen von Schilddrüsenhormonen auf zellulärer Ebene können vom Zellkern aus beginnen, an der Plasmamembran, im Zytoplasma oder in den Mitochondrien (Cheng SY 2010).

Gelangen Schilddrüsenhormone vom Blut in die Zelle und dann aus dem Zytoplasma in den eukaryotischen Zellkern, so wirken sie dort im Zellkern mittels spezifischer Kernrezeptoren

(nuclear receptor NR) (Kleine und Rossmanith 2007). Dies ist der klassische molekulare Mechanismus, wie das Schilddrüsenhormon T_3 mit Schilddrüsenhormon-spezifischen Proteinen interagiert und nachfolgend die Genexpression gezielt steuert. Dieser Mechanismus findet sich überwiegend in normalen Zellen (Davis 2019).

Abbildung 12 Wirkorte von Schilddrüsenhormonen im Überblick

nach (Davis 2019)



Krebszellen, in Teilung begriffene Endothelzellen, Phagozyten und Thrombozyten reagieren auf die Bindung des Liganden T_4 an das membranständige Integrin $\alpha\beta 3$ (Davis 2019). In intakten Tumorzellen kann der T_4 -Integrin-Komplex eine ganze Reihe von Genen modulieren, die in das Zellwachstum, den Zellstoffwechsel und Abwehrmechanismen der Krebszelle gegen Apoptose steuern. Auch eine Wirkung auf die für Krebszellen essenzielle Angiogenese über die Beeinflussung von vaskulären Wachstumsfaktoren wird diskutiert. T_4 aktiviert Thrombozyten über $\alpha\beta 3$ aus den blutbildenden Megakaryozyten. Eine grundsätzlich ähnliche Wirkung von rT_3 wird ebenfalls zur Zeit intensiv diskutiert (Davis 2019).

2.7.8 Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR)

Die Schilddrüsenhormonrezeptoren (thyroid receptor TR) sind eine Gruppe von Kernrezeptoren, also Transkriptionsfaktoren, die sehr spezifisch und gezielt ihre Zielgene an- oder ausschalten können (Davis 2019).

Kernrezeptoren regulieren allgemein zahlreiche physiologische Vorgänge wie den Metabolismus, sie beeinflussen die Fortpflanzung, Entzündungsreaktionen und den circadianen Rhythmus. Fehlregulationen der Kernrezeptoren führen zu verschiedenen Krankheiten, Stoffwechselstörungen und Entzündungsreaktionen. Daher das therapeutische Interesse an ihnen stetig gewachsen und mit einem wachsenden Verständnis an dieser Stelle der Regulation auch die Hoffnung auf bessere Therapien (Weikum 2018).

Bislang sind zwei verschiedene, spezifische Schilddrüsenhormonrezeptoren bekannt, $TR\alpha$ und $TR\beta$. Sie sind mit den Steroidrezeptoren eng verwandt und besitzen sowohl für den jeweiligen Liganden wie auch für eine jeweils Gen-spezifische DNA-Sequenz eine Bindungsdomäne. Die Bindungsaffinität der TR für T_3 ist deutlich höher als die für T_4 , nämlich ca. 20 bis 30-fach (Sandler 2004). TR beeinflussen die biologische Aktivität von T_3 über Transkriptionsregulation. Die zwei TR Gene, $TR\alpha$ und $TR\beta$, codieren für vier Isoformen eines T_3 -bindenden Rezeptors ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 3$) (Cheng SY 2010).

Kernrezeptoren sind bislang bei Säugetieren nachgewiesen worden (Sandler 2004); es ist aber zu erwarten, dass sie bei den meisten höheren Tieren, vielleicht sogar bei den meisten mehrzelligen Eukaryoten, in irgendeiner Form vorhanden sind. Bislang sind 48 menschliche Kernrezeptoren gefunden worden für alle Steroidhormone, T_3 und T_4 sowie für Vitamin D und A (Kleine und Rossmanith 2007).

Bislang konnte leider noch nicht geklärt werden, ob die Hormone, die an Kernrezeptoren binden und somit direkt an der DNA-Regulation beteiligt sind, dadurch freigesetzt werden, dass in der Nähe der Zielzelle das Transportprotein TBG gespalten wird und somit das T_4 freigesetzt wird. Bei Vitamin D ist bekannt, dass Enzyme das Bindungsprotein spalten, was zur Vitaminfreisetzung führt (Kleine und Rossmanith 2007). Dies wäre für die Schilddrüsenhormone ein ebenfalls äußerst plausibler und wahrscheinlicher Mechanismus, um zielgenau die Hormonwirkung an der benötigten Stelle zu erreichen (Kleine und Rossmanith 2007).

2.8 Das Thyroxin-bindende Globulin, ein Serpin

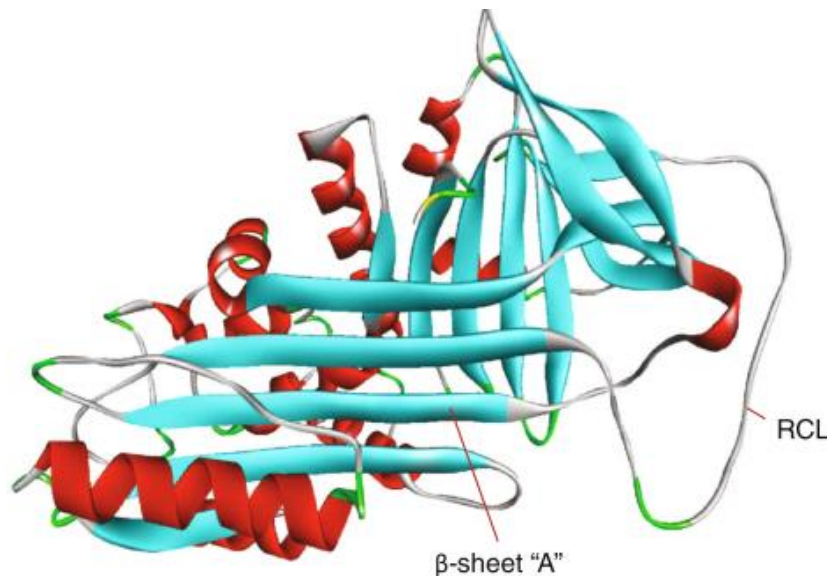
2.8.1 Die Proteinfamilie der Serpine

Das Haupttransportprotein für Schilddrüsenhormone im Blut ist das TBG, das Thyroxin bindende Globulin, ein im Plasma vorkommendes Glykoprotein. Es gehört zu einer der großen Proteinfamilien, den Serpinen.

Serpine sind eine stetig größer werdende Superfamilie von strukturell ähnlichen, aber funktionell teilweise sehr unterschiedlichen Proteinen, von denen bisher schätzungsweise über 1500 verschiedene in den Genomen aller fünf Reiche des Lebens beschrieben wurden (Irving, 2000), (Silverman, 2001) (Heit, 2013). Serpine besitzen untereinander starke strukturelle Ähnlichkeiten, können aber funktionell sehr verschieden sein. Ursprünglich

wurden sie als **Serinproteaseinhibitoren** beschrieben, also Moleküle, die Serinproteasen spezifisch inaktivieren (Heit, 2013).

Abbildung 13 Grundstruktur eines nativen Serpin A-Moleküls



Reaktive Schleife (RCL) und β -Faltblatt „A“ sind markiert. Rot: α -Helizes; blau: β -Faltblattstrukturen. Aus: (Heit 2013).

Bislang wurden beim Menschen 36 Gene beschrieben, die für Serpin-Proteine codieren. Anhand von Sequenzhomologien werden sie in die Kladen A bis P eingeordnet, wobei die menschlichen Serpine in A bis I zu finden sind. Diese derzeitige Einteilung der Serpine basiert auf ihrer phylogenetischen Verwandtschaft (Heit, 2013), soweit sie uns bisher bekannt ist. Viele Serpine wurden ursprünglich nach ihrem Vorkommen in bestimmten Geweben oder nach ihrer Funktion benannt.

1999 wurden die Serpingene einer eigenen Nomenklatur unterworfen, um sie besser zu strukturieren. SERPIN wurde das Gensymbol, da es sehr bekannt und in der Literatur verbreitet war und ist (Heit, 2013).

Die Serpine spielen vielfältige Rollen in physiologischen und auch pathologischen Zuständen, in der Entwicklung, der Homöostase und bei der Immunabwehr der Organismen (Silverman, 2001) (Heit, 2013). Andere Serpine haben keine inhibitorische Funktion und dienen anderen Zwecken, wie zum Beispiel dem Transport von Hormonen (Thyroxin-bindendes Globulin TBG; Corticosteroid-bindendes Globulin CBG), oder wirken bei der Regulation des Blutdrucks mit (Angiotensinogen). Sie wirken als Polymere pathologisch und bei Krebsmetastasierungen mit (Heit, 2013). Klinisch relevant sind Mutationen in Serpinen, die zu Krankheitsbildern führen wie Gerinnungsstörungen, Emphysemen, Zirrhosen und Demenz; viele davon sind eine Folge von Polymerisationen (Heit, 2013). Serpine beeinflussen offenbar die Aggregation von Proteinen. So wurde die Expression von SERPINI1 mit Demenz korreliert und eine Anhäufung von SERPINA5 in den Plaques bei Multipler Sklerose nachgewiesen. Die

Polymerisation von SERPINA3 kann den Beginn und die Schweregrad des Verlaufs von Alzheimer beeinflussen (Heit 2013).

Die meisten Serpine inhibieren Serinproteinasen aus der Chymotrypsin-Familie (Heit, 2013). Serinproteasen wiederum gehören, biochemisch gesehen, zur Enzymfamilie der Peptidasen, die als C-N-Hydrolasen die Spaltung einer Peptidbindung katalysieren. Humane Proteinasen wurden 2005 umbenannt in Peptidasen, der Begriff Serpine blieb aber bestehen (Heit, 2013). Serinproteasen besitzen Serin und Histidin im aktiven Zentrum und stellen die häufigste Klasse der Peptidasen dar. Zu ihnen gehören u.a. die Verdauungsenzyme Trypsin und Chymotrypsin (Karlson, 2005). Viele Enzyme des Gerinnungssystems sind ebenfalls Serinproteasen und Serinprotease-Inhibitoren (Altmeyer, 2020). Mittlerweile ist jedoch längst klar geworden, dass viele Serpine nicht als Inhibitoren, sondern als Chaperone fungieren (Heit, 2013). Molekulare Chaperone sind Faltungshelfer, also vorübergehend an Faltungsintermediate bindende Proteine, die dadurch bei Faltungsvorgängen während der Proteinneogenese assistieren (Spektrum der Wissenschaft, 2020).

DNA-Sequenzanalysen der bisher beschriebenen Serpine zeigten eine große Varianz der absoluten Anzahl der Serpin-Gene je nach untersuchter Art auf, im Verhältnis zur Gesamtzahl der vorkommenden Gene je Art. Daher kann man vermuten, dass zumindest bei einigen Serpinen teilweise unterschiedliche Funktionen evolvierten trotz einer sehr stark konservierten Sequenz und Struktur dieser Proteine (Silverman, 2001). Hierzu gehören beispielsweise TBG, CGB und andere, die als Bindungsproteine komplett verschiedene Aufgaben im Körper wahrnehmen als ihre inhibitorischen oder chaperonischen Verwandten. Ursache solcher Varianzen sind - meist zufällige - Genduplikationen, die im Laufe der Zeit dann zu unterschiedlichen Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen evolvierten.

Serpine besitzen alle eine ähnliche Größe und bestehen aus 350 bis 500 Aminosäuren (Silverman, 2001) bzw. 350 bis 400 Aminosäuren (Heit, 2013), die sich bei der Proteinneogenese in eine relativ konservierte Sekundär- und Tertiärstruktur falten.

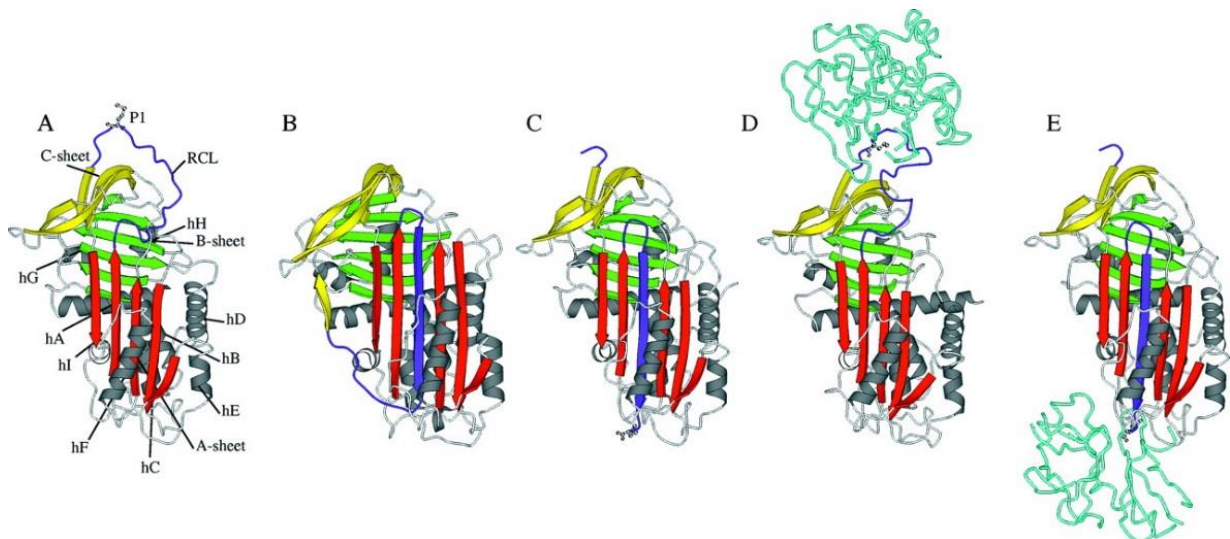
Im nativen Stadium sind Serpine Monomere. Sie besitzen alle eine metastabile Konformation, die für die inhibitorische Wirkung zwingend notwendig ist, und die sich bei Bedarf durch intramolekulare Änderungen umformen kann. Es ist bemerkenswert, dass die native Form der Serpine nicht kinetisch am stabilsten ist, sondern nur metastabil (Heit, 2013). Diese metastabile Konformation besteht aus einer sehr konservierten Sekundärstruktur, die sich zusammensetzt aus den β -Faltblättern A, B und C, neun α -helikalen Bereichen sowie einem RCL (reactive center loop), einer Schleife im reaktiven Zentrum, die als „Köder“ für die Zielprotease dient (Irving, 2000). Dieser Teilbereich, der bei den enzymatisch wirkenden Serpinen die Protease-Erkennungssequenz beinhaltet, ist ein exponierter, beweglicher Abschnitt aus ungefähr 17 Aminosäuren, die sich zwischen den β -Faltblättern A und C befinden. Serpine kommen in mehreren räumlichen Formen vor, die anhand der reaktiven Schleife definiert werden: aktiv (= nativ), latent, geschnitten, delta und polymer (Heit, 2013). Sie sind in ihrer latenten Form nicht inhibitorisch wirksam, können aber durch Denaturierung und erneute Faltung wieder erneut aktiviert werden. Der Inhibitionsmechanismus ist selbstzerstörerisch und irreversibel (Silverman, 2001).

Die Mitglieder der Serpin-Klade A besteht neben TBG aus 13 weiteren Proteinen, darunter CBG und dem α -1-Antiproteinase Inhibitor (= α -1-Antitrypsin (Irving, 2000) (Heit, 2013). Klade A enthält Trypsin-ähnliche, extrazelluläre Serpine, die in elf menschlichen Genen (1, 3-12) und zwei Pseudogenen kodiert werden (Heit, 2013).

Dieser extreme Funktionswandel von vermutlich einem einzigen Serpin-Vorfahren zu einer großen Familie verwandter, aber funktionell verschiedenartigster Proteine ist evolutionär durchaus nicht selten; ein sehr gut erforschtes, wenn auch nicht verwandtes Beispiel hierfür sind die Porphyrine, deren prominentester Vertreter Hämoglobin bei allen Wirbeltieren für den Sauerstofftransport im Blut zuständig ist. Chemisch eng verwandt sowohl im Aufbau als auch bei der Biosynthese sind der grüne Blattfarbstoff Chlorophyll, der das Sonnenlicht bei der Photosynthese absorbiert, und die Cytochrome, die bei der Elektronenübertragung in der Atmungskette mitwirken (Nelson, 2008). Daher überrascht der Funktionswandel eines Serpins von einem Proteaseinhibitor zum einem Bindungsprotein wie beim TBG, mit dem sich diese Arbeit im Speziellen beschäftigt, nicht wirklich, da er in der Evolution komplexer Moleküle und ihrer Gene häufiger vorkommt.

Abbildung 14 Serpinstrukturen im Vergleich

(alle: Protein Data Bank, (Silverman 2001))



Von links nach rechts: A, natives α_1 AT; B, latentes ATIII; C, geschnittenes α_1 AT; D, Michaelis-Komplex zwischen Serpin 1 (Alaserpin aus *Manduca sexta*) und Trypsin; E, kovalenter Komplex zwischen α_1 AT und Trypsin.

Bei allen Strukturen ist das A-Faltblatt rot, das B-Faltblatt grün, das C-Faltblatt gelb und das RCL lila eingefärbt dargestellt. β -Helizes sind grau und Trypsin ist eine cyanblaue Schleife (Silverman 2001).

Die Begriffe nativ, latent, geschnitten usw. beschreiben jeweils unterschiedliche Konformationen des Moleküls in Bezug auf das reaktive Zentrum (Lomas DA 1995).

2.9.2 Charakteristika des Thyroxin-bindendes Globulins

TBG ist, wie bereits erwähnt, ein Serpin, das keine inhibitorische Wirkungsweise mehr hat, sondern sich zu einem Transportprotein weiter evolvierte. Es ist das Haupttransportprotein

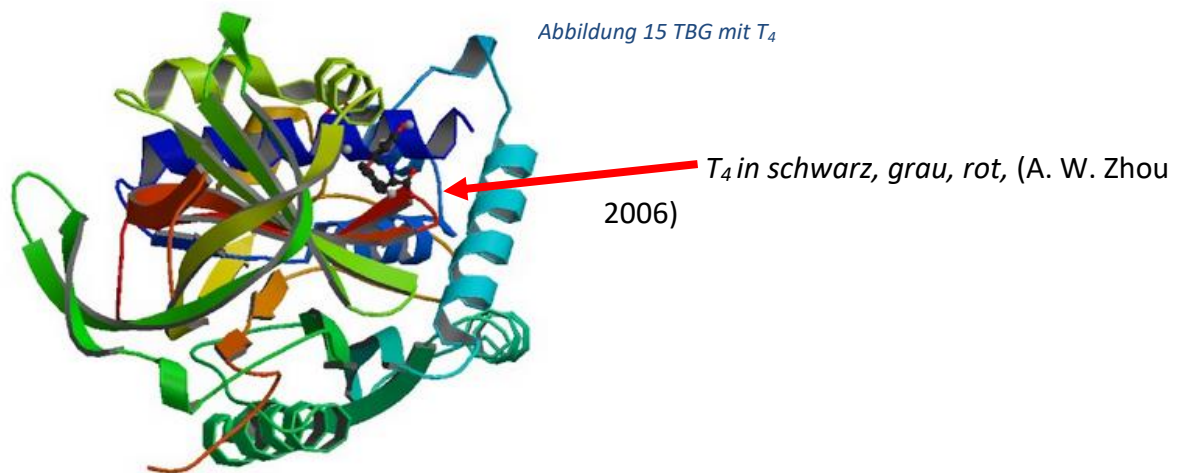
für Schilddrüsenhormone, insbesondere für T_4 , im menschlichen Serum und hat eine sehr hohe Bindungsaffinität zu seinem Liganden T_4 mit einem K_a von $1,6 \times 10^{10}/M$. Zum Vergleich: die Bindungsaffinität zu Transthyretin liegt bei $7 \times 10^7/M$ und zu Albumin bei $7 \times 10^5/M$. TBG bindet daher 75% des Serum- T_4 , während Transthyretin 20% und Albumin nur 5% binden. Evolutionär gesehen entwickelten sich die drei Serumproteine in umgekehrter Reihenfolge zu ihrer Affinität, wobei Albumin das älteste darstellt (Refetoff und Refetoff, Thyroid Hormone Serum Transport Proteins 2015). Pro Molekül TBG wird ein Molekül T_4 gebunden. Beim Menschen liegt die Serumkonzentration bei etwa 250 nmol/l (= 20µg/100ml).

Die Primärstruktur des TBGs besteht aus 415 Aminosäurebausteinen, wovon die ersten 20 Aminosäureglieder ein hydrophobes Signalpeptid darstellen, das posttranslational im endoplasmatischen Retikulum abgespalten wird. Das resultierende Molekül besteht aus 395 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 44 kDa (Flink IL 1986). TBG wird posttranslational modifiziert durch N-Glykosylierung; sein Kohlenhydratanteil macht ca. 20% Gewichtsprozent aus. Es besitzt in der Primärstruktur fünf Erkennungssequenzen für N-glykosidische Bindungen von Kohlenhydraten an Asparaginreste, von denen *in vivo* vier tatsächlich mit Zuckerketten beladen werden. Diese sind bedeutsam für die Serumclearance des Proteins: je stärker das TBG glykosyliert ist, desto länger kursiert es im Blut, bevor es abgebaut wird.

Die Halbwertszeit von T_4 im Blut beträgt ca. fünf bis acht Tage, da es durch die Bindung an TBG ebenfalls vor dem Abbau geschützt wird. T_3 , das eine wesentlich niedrigere Affinität an TBG hat, hat daher auch eine viel kürzere Halbwertszeit im Blut von 19 Stunden.

Die Glykosylierung ändert sich je nach physiologischem Zustand. Östrogene erhöhen die Konzentration an TBG im Blut ebenso wie chronische oder akute Hepatiden, eine kompensierte Leberzirrhose oder eine akute intermittierende Porphyrie. Im Kindesalter ist der TBG-Spiegel erhöht und es sind genetisch bedingte TBG-Vermehrungen bekannt (Ziegler 1993). Androgene und Hormone der Nebennierenrinde erniedrigen die TBG-Konzentration dagegen (Vaupel 2015), ebenso wie renale und intestinale Proteinverlustsyndrome, chronische Niereninsuffizienz, extremes Fasten und genetisch bedingter Mangel (Ziegler 1993).

Die Kristallstruktur von TBG, aus *Escherichia coli* isoliert, wurde 2006 geklärt (A. W. Zhou 2006).



T_3 ist ein Transkriptionsfaktor, der einerseits die Genaktivität in der Zelle reguliert, indem er zusammen mit Transkriptionsfaktoren an die DNA bindet, an der es aber auch eine direkte Bindungsstelle am Zellkern gibt. T_4 selbst ist lediglich ein Prohormon, das erst nach Umwandlung in T_3 seine Wirkung entfaltet. Für Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass T_4 mit Integrin zusammen auch direkt als Transkriptionsfaktor wirkt (Davis 2019).

Wird mit T_4 beladenes TBG in vivo von einem Enzym in der reaktiven Schleife gespalten, so wird der Ligand T_4 freigesetzt, der als Prohormon zu T_3 umgewandelt wird, das wiederum an Kernrezeptoren bindet. Durch die Spaltung des TBGs und die nachfolgende Freisetzung von T_4 kann das durch Deiodasen anschließend in T_3 umgewandelte so vor Ort in der Zielzelle sehr genau dosiert werden und wirken. Das im Blut gebundene T_4 muss erst freigesetzt und intrazellulär umgewandelt werden, bevor es als T_3 seine Aktivität dort zielgenau entfalten kann.

2.9.3 Genetik des SERPINA7-Gens (TBG-Gen)

Das Gen des Thyroxin-bindenden Globulins wird seit der Einführung der Serpin-Nomenklatur als „SERPINA7“ bezeichnet, d.h. es gehört zur Klade A und die 7 weist auf die Nummer des Gens innerhalb der Klade hin (Heit 2013).

Der Genbereich „serpin family A member 7“ bzw. SERPINA7 ist daher synonym mit dem Begriff TBG-Gen (ensembl.org 2020).

Es ist beim Menschen x-chromosomal kodiert (Kleine und Rossmanith 2007), Abschnitt Xq22.2 im Bereich 106,032,435-106,038,727 des reversen Strangs (Heit 2013) (ensembl.org 2020). Das Gen trägt 5 Exons; es sind keine alternativen Transkripte bekannt (Heit 2013).

Es gibt drei bekannte Splicingvarianten des Gens, 95 orthologe und 36 paraloge Gene. Die drei Proteine, die aus dem exakt gleichen DNA-Abschnitt durch unterschiedliches Splicing

entstehenden Proteine sind TBG, α -1 Antiproteinase und Antitrypsin (ensembl.org 2020).

Tabelle: Übersicht über die Klade A der Serpine (SERPINA), (Alpha 1 – Proteinase-inhibitor Antitrypsin), nach (Heit 2013)

Gen	Alias	Funktion
SERPINA1	Alpha 1PI	Entzündungen, Komplementaktivierung, Apoptose
SERPINA2		?
SERPINA3	Alpha1 ACT	Apoptose, Alzheimer, Entzündungen, Komplementaktivierung, Umwandlung von Prohormonen
SERPINA4	PI4, KST, KAL	Leberfunktionen, Entzündungen, Komplementaktivierung
SERPINA5	PCI	Entzündungen, Komplementaktivierung, Koagulation, Aktivierung von Spermien
SERPINA6	CBG	Hormontransport
SERPINA7	TBG	Hormontransport
SERPINA8	AGT	Regulation des Blutdrucks, renale Entwicklung
SERPINA9	Centurin	Entwicklung von B-Zellen
SERPINA10	PZI	Inhibition von aktivierten Faktoren Z und XI
SERPINA11		?
SERPINA12	Vaspin	inhibiert Kallikrein; unklare Rolle in der Insulinsensitivität
SERPINA13P		?

2.9.4 Glykosylierungen des TBGs

Hyperöstrogene physiologische Zustände wie z.B. eine Schwangerschaft führen zu erhöhten Konzentrationen an TBG im Serum. Untersucht man das TBG mittels isoelektrischer Fokussierung, so weist es dann eine höhere Beweglichkeit zur Anode hin auf, was auf einen erhöhten Anteil an Sialylsäure hinweist (Gärtner 1981) (Ain 1987).

Die ersten vier der fünf potenziellen Glykosylierungsstellen des TBGs werden in vivo glykosyliert. Daher hat das reife Protein ein Gesamtgewicht von 54 kDa (Gershengorn 1977) (Zinn AB 1978).

Nach Untersuchungen von (Murata Y 1986) scheint der Kohlenhydratanteil des TBG für die korrekte Faltung und Sekretion des Moleküls verantwortlich zu sein (Murata, Magner et al. 1986) sowie für das Verhalten bei der Isoelektrischen Fokussierung (Gärtner 1981) und die Serum-Clearance durch die Leber (Ain 1987).

Man untersuchte das TBG, im Blut von Probanden das jeweils unterschiedlich stark glykosyliert war und sich somit im isoelektrischen Punkt unterschied, bei schwangeren und nicht schwangeren Frauen sowie bei Männern. Eine Analyse der Halbwertszeiten der unterschiedlichen TBGs ergab einen signifikant erhöhten Serumspiegel im Blut von schwangeren Frauen. Bei diesen fand sich ein deutlich erhöhter Anteil an TBG-Molekülen mit hochmolekularen Sialylsäuren, die durch die stärkere Glykosylierung langsamer hepatisch abgebaut wurden und dadurch eine längere Serumhalbwertszeit aufwiesen.

Dies bedeutet, dass in vivo der Turnover von TBG im Körper direkt vom Gehalt an Sialylsäure

abhängig ist (Ain 1987).

Vergleicht man das TBG verschiedener Spezies in Bezug auf die N-Glykosylierungsstellen, so kann man folgende, sehr konservierte Aminosäurepositionen beobachten:

	Mensch	Ratte	Schaf
Signalpeptid	1-20	1-20	1-16
Gesamtlänge inkl. Signalpeptid	415	418	412
Stelle der N-Glykosylierung (inkl. Signalpeptid)	-	24	-
	36	39	35
	99	102	98
	165	168	164
	-	227	-
	256	256	252
	411	-	-

(Tabelle nach: (uniprot.org 2020))

Bei allen untersuchten Serpinen außer beim CBG werden in vivo stets weniger Glykosylierungsstellen benutzt als tatsächlich in der Primärstruktur vorhanden sind. Zwei zusätzliche N-Glykosylierungsstellen in Position 24 und 227 kommt nur bei der Ratte vor (uniprot.org 2020). Die nächsten vier sind streng konserviert und sie sind im Prinzip homolog bezüglich ihrer Position; die Nummerierung verschiebt sich lediglich durch drei zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus bei Schaf und Ratte gegenüber dem humanen TBG.

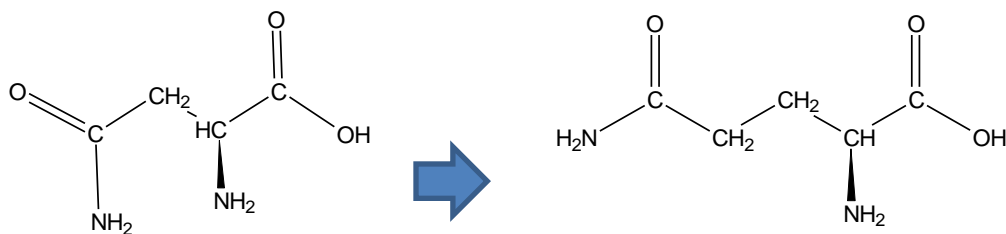
3 Methoden und Ergebnisse

3.1 Herstellung von Glykosylierungsmutanten des Thyroxin-bindenden Globulins

Um die Frage genauer zu untersuchen, welche Rolle die Glykosylierungen des TBGs bei der korrekten Faltung und der Sekretion sowie für das Verhalten bei der isoelektrischen Fokussierung spielen, sollten mutierte TBG-Moleküle untersucht werden.

Hierfür wurden im Gen des TBGs, das in ein bakterielles Plasmid geklont wurde, künstliche Mutationen verursacht, die die Bindungsstellen für die Glykosylierungen bereits auf DNA-Ebene zerstörten. Dazu wurde der genetische Code für die Aminosäure Asparagin derart verändert, dass eine andere Aminosäure codiert wurde, die chemisch sehr ähnlich sein war, damit es möglichst nicht zu Änderungen in der Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins kam. Das neue Protein konnte aber nicht mehr an dieser Stelle glykosyliert werden, da das Asparagin und somit die Konsensus-Sequenz nicht mehr vorhanden war.

Abbildung 16 Austausch der Aminosäuren



Asparagin, links, wurde ausgetauscht gegen Glutamin

Anschließend wurden die mutierten Proteine *in vitro* hergestellt und auf ihre Funktionalität hin untersucht.

3.1.1 Klonierung des TBG-Gens in den pSelect-Vector und gerichtete Mutagenese

Zur Analyse der Funktion der Glykosylierungen wurden die N-Glykosylierungsstellen durch gerichtete Mutagenese auf DNA-Ebene zerstört und die neuen Proteine *in vitro* exprimiert. Dies wurde erreicht durch einen Basenaustausch in der Basensequenz des TBG-Gens, der zum Ersatz von Asparagin durch Glutamin führt, mit anschließender Genanalyse der Klone und *in vitro* Expression der mutierten Proteine.

N-Glykosylierungsstelle Asn – X – Thr

Aminosäure	Ser	Ser	Gln	Pro	Asn	Ala	Thr	Leu	Tyr	Lys	Met	Ser
Basentriplett	TCA	TCC	CAA	CCA	AAT	GCC	ACT	CTC	TAC	AAG	ATG	TCA

Gerichtete Mutagenese führt zum Basenaustausch

Aminosäure	Ser	Ser	Gln	Pro	Gln	Ala	Thr	Leu	Tyr	Lys	Met	Ser
Basentriplett	TCA	TCC	CAA	CCA	CAA	GCC	ACT	CTC	TAC	AAG	ATG	TCA

⇒ Es ist keine Glykosylierungsstelle mehr vorhanden

Hierfür konnte die bereits in einen Vektor klonierte cDNA des menschlichen TBG-Gens verwendet werden.

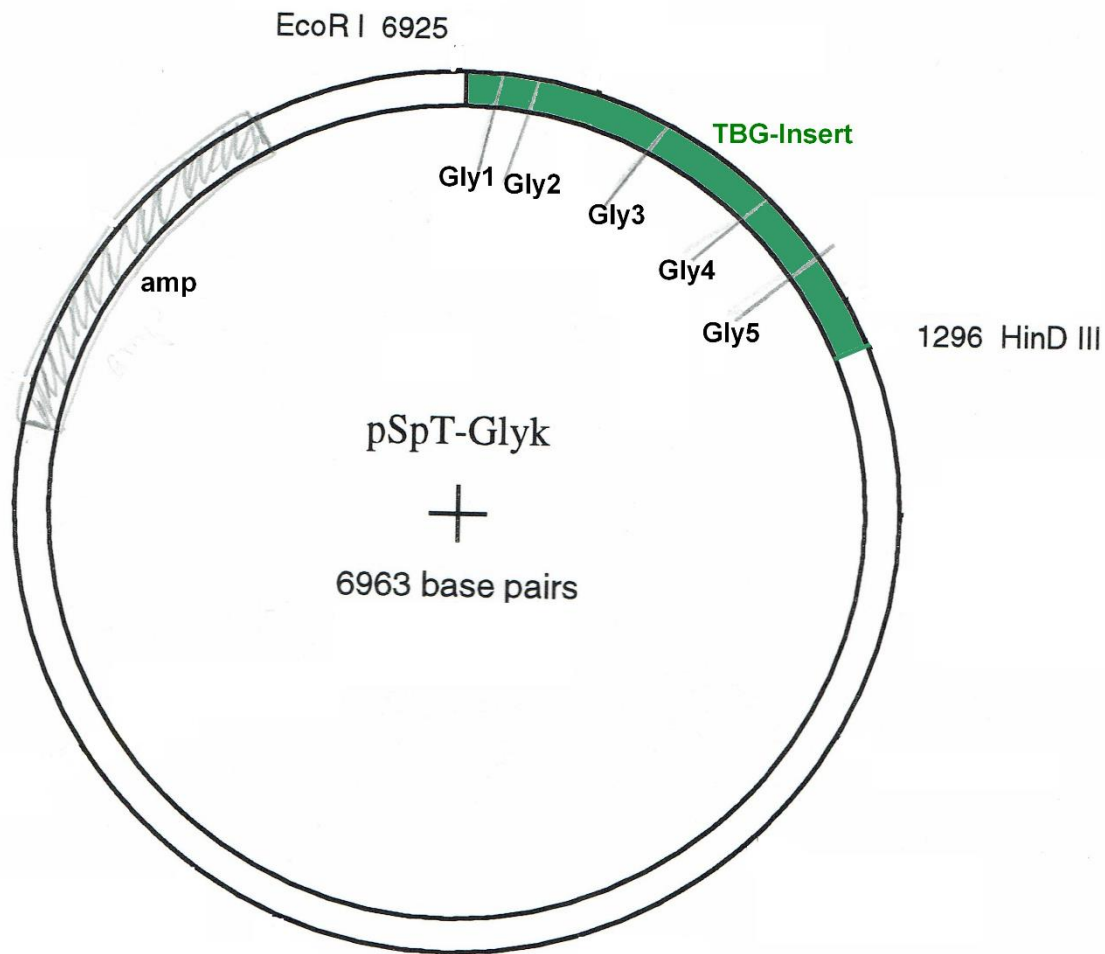


Abbildung 17 pSelect-Plasmid mit TBG-Gen

TBG-Gen (grün); die Glykosylierungsstellen sind markiert. amp Ampicillinresistenz, EcoRI und HindIII Schnittstellen der Restriktionsenzyme (vollständige Karte s. Methoden)

Die gerichtete Mutagenese wurde mit dem “Altered Sites”-System[®] durchgeführt, das den Vektor pSelect[®] verwendet, in den zunächst über eine multiple cloning site (mcs) die cDNA des menschlichen TBGs zwischen einer T7- und einer SP6-Promotorsequenz einkloniert wurde. Das Produkt wurde pSpT-28 genannt.

Vor der TBG-Sequenz befindet sich der Promotor für die RNA-Polymerase T7, die nachfolgend für die *in vitro*-Synthese von synthetischer mRNA verwendet werden konnte. Der Vektor pSelect[®] trägt eine Tetrazyklinresistenz und außerdem eine Ampicillinresistenz, die durch eine Deletion inaktiviert ist. Während der Mutagenesereaktion verändert man außer der gewünschten Stelle im TBG-Gen zusätzlich die Ampicillinresistenz, die dadurch wieder aktiviert wird und somit einen geeigneten Selektionsmarker darstellt. Durch Zugabe von Ampicillin wurden später alle Bakterien abgetötet, die das mutierte Plasmid nicht besitzen.

Für die Mutagenesereaktion wurde zunächst eine Minikultur eines geeigneten *E. coli*-

Stammes herangezuchtet, der den Vektor pSpT-28 trug. Hierfür wurde der E. coli - Stamm JM109 verwendet.

Durch gezielte Zugabe eines Phagen, der ein M13-Derivat war, entstand dann einzelsträngige DNA aus dem pSpT-28. Einzelstrang-DNA ist notwendig, um aus der DNA künstliche mRNA zu synthetisieren.

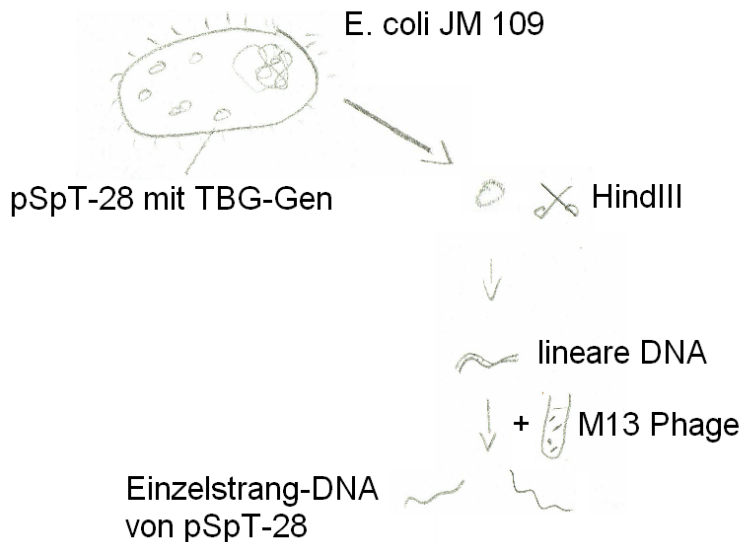


Abbildung 18 Herstellung von ssDNA für die Mutagenesereaktion

Unter geeigneten Reaktionsbedingungen lagerten sich die zur Mutagenese speziell synthetisierten Oligonukleotide an die gereinigte und isolierte Einzelstrang-DNA (ssDNA) an. Der Gegenstrang der ssDNA wurde durch Zugabe von DNA-Polymerase und DNA-Ligase ausgehend von den angelagerten Oligonukleotiden *in vitro* synthetisiert und geschlossen. Die dabei entstandene doppelsträngige DNA bestand aus einem mutierten und einem Original-DNA-Faden, d.h. sie enthielt sog. Mismatches im veränderten Strang (s. Abb.).

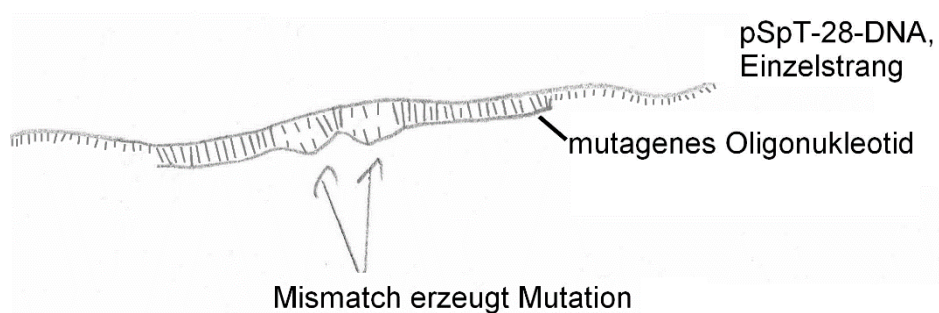


Abbildung 19 Anlagerung der Mutagenese-Oligonukleotide erzeugt Mutationen

Um zu vermeiden, dass nun diese „Fehler“ vom Reparatursystem des Bakteriums erkannt und neutralisiert werden, wurde die mutierte DNA in einen *reparaturdefekten E. coli – Stamm* transformiert, in dem die Plasmid-DNA dann vermehrt wurde.

Nach erneuter Isolation der Plasmide wurde die DNA in einen „normalen“ E. coli-Stamm transformiert, um daraus in großer Menge DNA zu isolieren. Der Vektor durfte nicht

langfristig in dem reparaturdefekten E. coli-Stamm verbleiben, um die Stabilität der Gene zu sichern.

Nach dieser Selektion wurde die gesamte Vektor-DNA sequenziert, um den Erfolg der Mutagenesereaktion zu überprüfen und eventuelle andere, unerwünschte Mutationen auszuschließen.

Ein Teil der DNA wurde mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten und somit linearisiert und anschließend gereinigt.

Durch *in vitro*-Transkription wurden größere Mengen an synthetischer mRNA gewonnen, die im Retikulozytenlysat translatiert und prozessiert werden konnte oder die direkt in *Xenopus*-Oozyten injiziert werden konnte.

Die Vorgehensweise im Detail (Methodische Details und Lösungen s. Anhang):

3.1.1 Herstellung einzelsträngiger Vektor-DNA

Die Oligonukleotide müssen maximal komplementär zu dem Bereich des TBG-Gens sein, in dem die Mutation erzeugt werden soll, abgesehen von der zu veränderten Sequenz. Dabei sollte der zu mutierende Bereich in der Mitte des Oligonukleotides liegen, um eine ausreichende Anlagerung des Oligonukleotides an die Plasmid-DNA zu gewährleisten. Das Oligonukleotid sollte mindestens 24 Basen groß sein.

Da die Oligonukleotide synthesebedingt am 5'-Ende keinen Phosphatrest tragen, wurden sie zuerst phosphoryliert.

Für die Mutagenese wird einzelsträngige Vektor-DNA benötigt, die zunächst hergestellt unter Zuhilfenahme eines Bakteriophagen, der einzelsträngige DNA herstellt wurde.

3.1.2 Gerichtete Mutagenese

Man setzt einen Mutageneseansatz an, indem man zu der einzelsträngigen Vektor-DNA zum einen das Ampicillin-Reparaturoligonukleotid und das mutagene Oligonukleotid mit der gewünschten, veränderten Sequenz in einem geeigneten Puffer zufügt und erhitzt. Nach dem Abkühlen fügt man DNA-Polymerase und DNA-Ligase sowie Nukleotide hinzu, um den zweiten DNA-Strang zu vervollständigen.

1	mGly1	AAT -> CAA	5'- TCA TCC CAA CCA <u>CAA</u> GCC ACT CTC TAC -3'
---	-------	------------	--

Abbildung 20 Sequenz von mGly1, ein mutagenes Oligonukleotid

mGly1 ist ein mutagenes Oligonukleotid, das die 1. Glykosylierungsstelle im TBG-Gen veränderte (alle Sequenzen s. Kap. 6.3)

Nach der Durchführung der gerichteten Mutagenese wurden die erhaltenen, Ampicillin-resistenten Klone über den Bereich der jeweiligen gewünschten Mutation sequenziert.

Diejenigen, die in der gewünschten Position des TBG-Inserts auch tatsächlich wie gewünscht verändert waren, wurden als Maxipräparation hochgezüchtet und einer kompletten Sequenzierung des Inserts unterworfen.

Die Erfolgsquote der Mutagenese lag bei ca. 80%, d.h. vier von fünf Ampicillin-resistenten Klonen waren zusätzlich im Insert verändert.

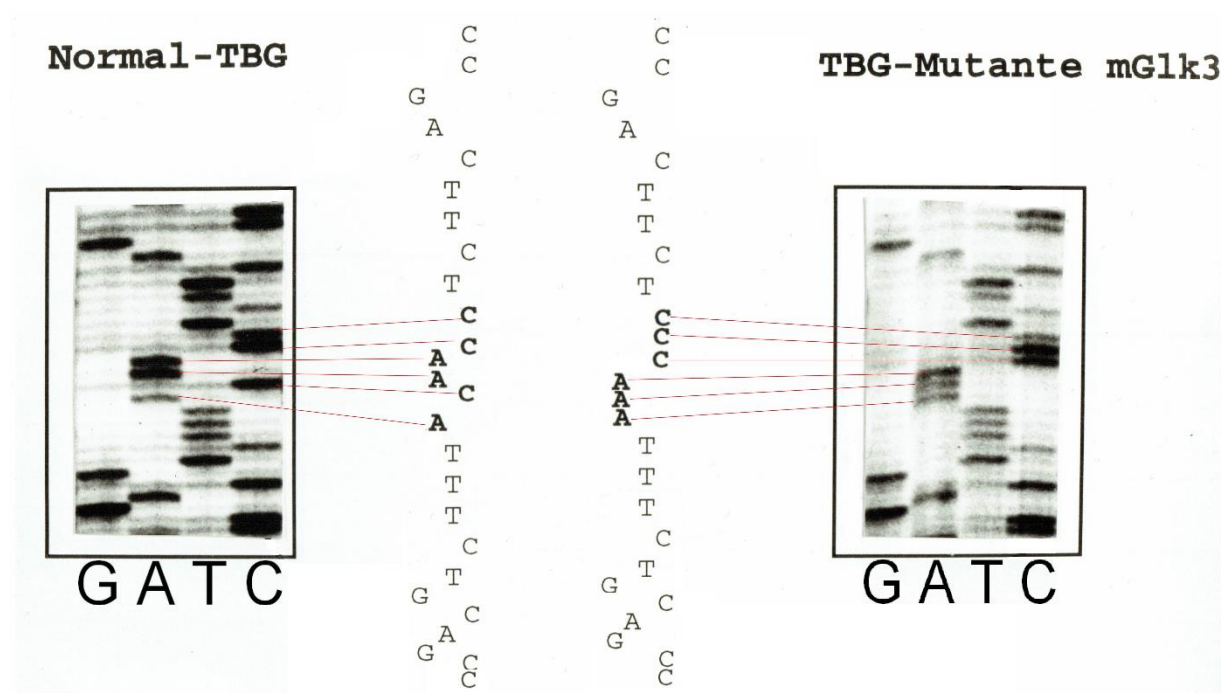
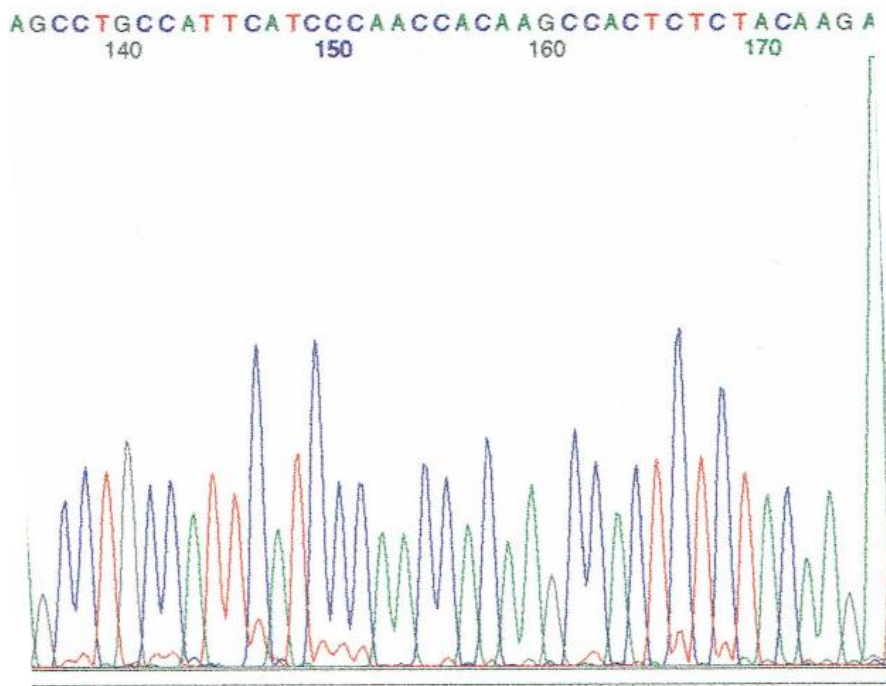


Abbildung 21 mutierte und nicht mutierte Sequenz der Glykosylierungsstelle 3

3.1.3 Transformation in *E. coli*

Der gesamte Mutageneseansatz wurde in kompetente *E. coli* BMH 7118 mut S transformiert und in einer Minikultur LB mit Ampicillin ü. N. bei 37°C inkubiert. Danach folgte eine Mini-Präparation der Vektor-DNA und eine erneute Transformation der gesamten isolierten Plasmid-DNA in *E. coli* JM109 auf LB amp-Platten. Die Einzelkolonien wurden in einer Minikultur hochgezogen, die Vektor-DNA isoliert und die DNA über die zu verändernde Stelle hinweg sequenziert.

Abbildung 22 Kontrollsequenzierung von mGly1 über die zu verändernde Stelle hinweg



3.2 Überprüfung der Mutagenese durch DNA-Sequenzierung

War der Klon an der gewünschten Stelle mutiert, wurde die Plasmid -DNA vollständig sequenziert.

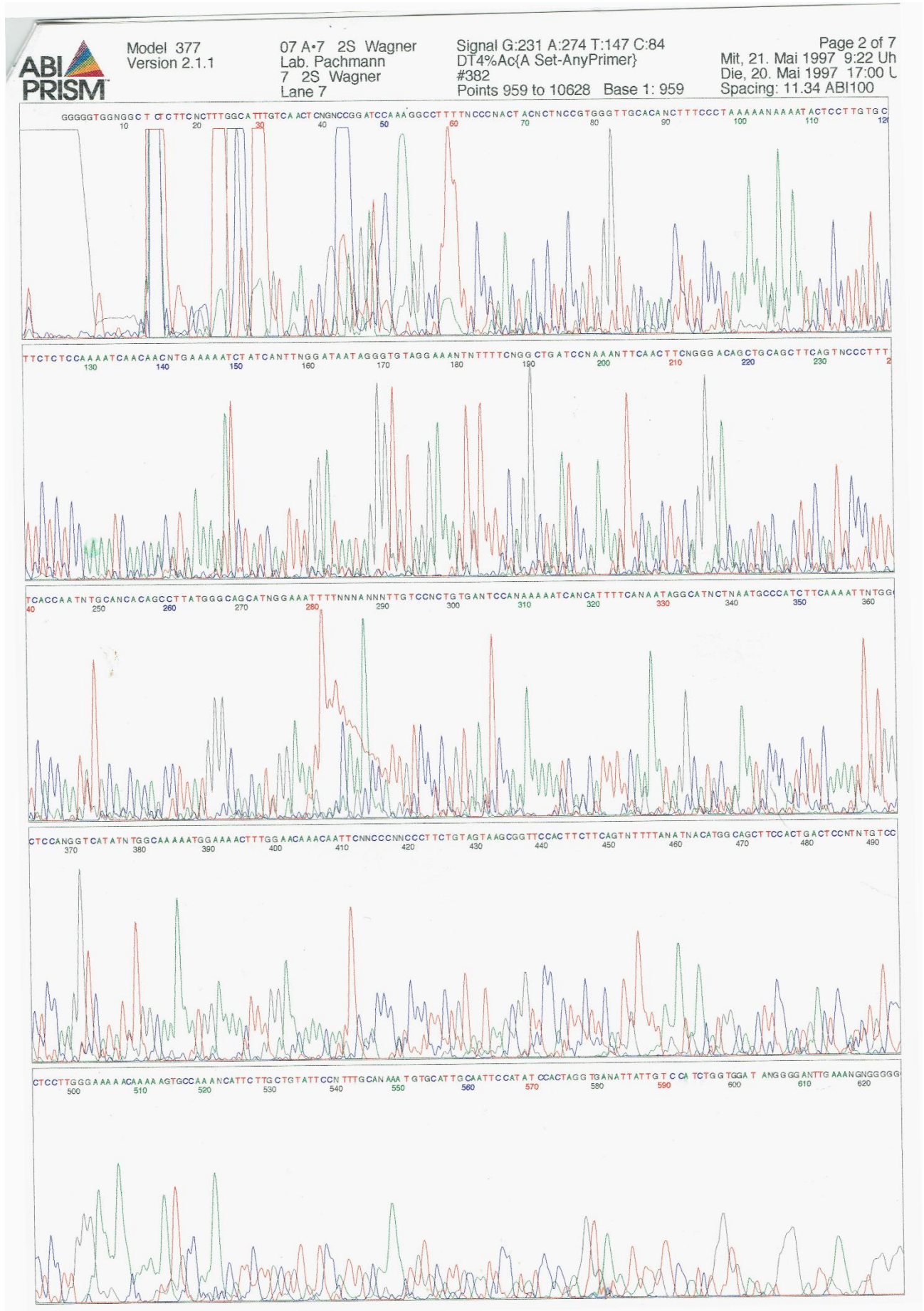
Hierfür wurde der Klon in einer größeren Menge angezüchtet, um eine geeignete Menge an Plasmid-DNA zu erhalten. Diese wurde aufgereinigt und die DNA sequenziert.

Im Laufe dieser Arbeit veränderte sich dabei die Methode der Sequenzierung dabei: Anfangs wurden manuell und mittels ^{35}S -dATP markierte PCR-Proben über PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt, das Gel getrocknet und über Nacht auf einem Röntgenfilm exponiert (Sequenase-Verfahren).

Später konnte ein ABI-Prism[®] eingesetzt werden, bei dem zur automatischen Sequenzierung die Proben-DNA mittels Cycle-Sequencing vervielfältigt wird. Dabei waren die Kettenabbruchnukleotide gleichzeitig mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt, die für jede Base Licht in einer anderen Wellenlänge emittieren. Jedes Abbruchnukleotid wird in einer eigenen Sequenzreaktion eingesetzt.

Zum Auftrennen über ein PAA-Gel werden danach alle vier Fraktionen in eine Spur aufgetragen und die unten ankommenden Fragmente mit einem Laser analysiert. Man sieht für jedes Bruchstück einen Peak im Analyseausdruck (s. nächste Seite) und erhält fortlaufend die DNA-Sequenz.

Abbildung 23 Sequenzierung der TBG-Mutante mGly5 mit ABI Prism



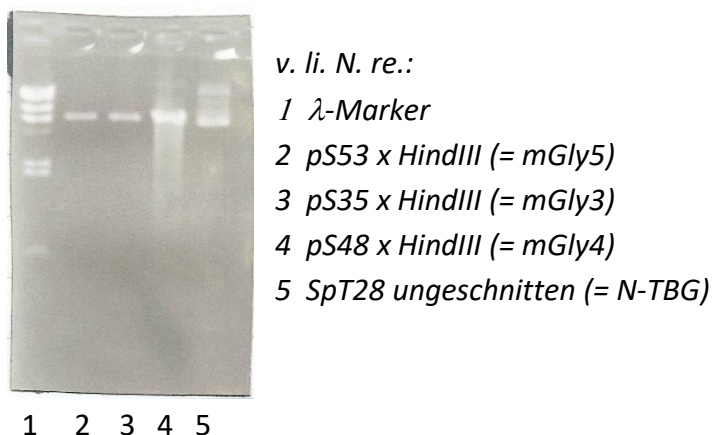
3.3 Expression der mutierten TBG-Varianten *in vitro*

3.3.1 Expression im Retikulozytenlysats

Das kommerziell erhältliche Retikulozytenlysats aus Kaninchen eignete sich sehr gut zur Überprüfung der Qualität der RNA sowie der korrekten Größe des entstehenden Proteins. Es ist ein zellfreies System, d.h. man erhält immer Proteine, sofern die eingesetzte RNA qualitativ und quantitativ ausreichend ist. Das System war allerdings sehr teuer und eignete sich nicht, um größere Mengen an Protein zu exprimieren.

Für die Verwendung des Lysates benötigte man zunächst lineare DNA, um daraus mRNA herzustellen. Zur Linearisierung der DNA wurde der Vektor mit einem geeigneten Enzym hinter dem Transkriptions-Stopp-Kodon des einklonierten Genabschnittes linearisiert. Bei allen pSpT28-Derivaten wurde dies mit dem Restriktionsenzym HindIII durchgeführt. Es wurde von jeder Mutagenesereaktion jeweils ein Klon ausgewählt, der in einer der fünf potentiellen N-Glykosylierungsstellen keine consensus-Sequenz mehr trug, und dieser wurde dann entsprechend benannt: mGly1, mGly2 usw. . Die DNA dieser Klone sowie die des Ausgangsvektors pSpT28 wurde mit HindIII hinter dem Transkriptionsstopp geschnitten, um lineare Nukleinsäuren zu erhalten. Die vollständige Verdauung wurde mittels eines analytischen, 1%-igen TBE-Agarosegel überprüft und mit einem Polaroidbild dokumentiert.

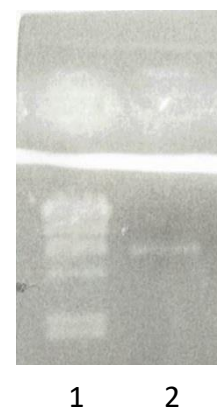
Abbildung 24 Polaroidbild eines Agarosegels



War die DNA vollständig geschnitten, wurde sie über eine Agarose-Gelelektrophorese isoliert und mittels Phenol-Chloroform-Ausschüttung für die nachfolgende Translationsreaktion gereinigt.

Abbildung 25 Agarosegel der DNA zur Kontrolle

1 λ -Marker
2 gereinigte DNA



Die notwendige Qualität und Quantität der geschnittenen Plasmid-DNA wurde durch UV-Densitometrie photometrisch bestimmt. Zur Bestimmung der Menge an DNA wurde die optische Dichte in Quarzküvetten bei 260 nm analysiert. Eine OD_{260} von 1 entsprach ca. 40 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA. Zur Bestimmung der Reinheit wurde die OD_{280} gemessen. Lag das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} über 1,3, so war die Nukleinsäureprobe ausreichend sauber und zur Weiterverwendung geeignet. Durch diese Bestimmung konnten nur Verunreinigungen durch Proteine und hier auch nur durch die aromatischen Aminosäuren erfasst werden, aber z.B. keine Salze.

SAMPLE	A280	A260	280/260	260/280
1.0000	0.0662	0.0970	0.6821	1.4661
2.0000	0.0221	0.0237	0.9341	1.0705
3.0000	0.0867	0.1367	0.6343	1.5766
4.0000	0.0408	0.0541	0.7552	1.3242
5.0000	0.0260	0.0320	0.8115	1.2323
6.0000	0.0277	0.0312	0.8860	1.1286

Abbildung 26 UV-Densitometrie der geschnittenen und aufgereinigten DNA

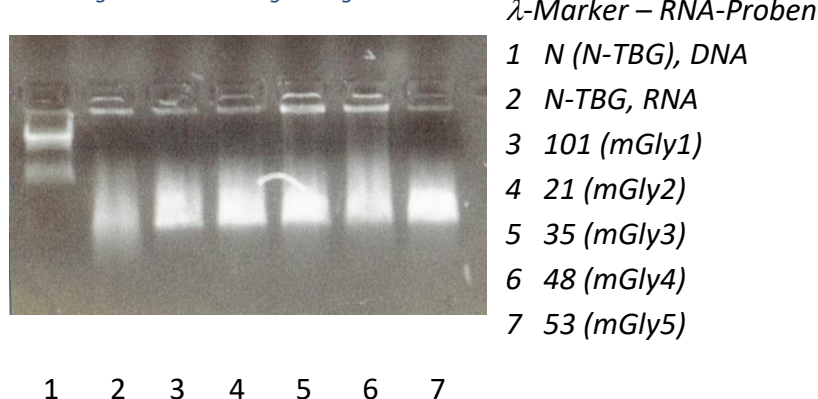
Klone 101, 35, 21, 48, 53, N (= mGly-Mutanten 1, 3, 2, 4, 5; N)

Die Nummern sind die Labor-internen Nummern der Klone.

Die anschließende Transkription der DNA in synthetische RNA mit „Cap“-Ende wurde mit dem „T7 mMessage mMachine“-Kit durchgeführt exakt nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurde die vorbereitete DNA verwendet sowie eine Mischung von Nukleotiden (NTPs) in einer geeigneten Pufferlösung. Durch Zugabe von Polymerase entstand RNA: Die T7-RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 ist ein Enzym, das die Bildung von RNA aus DNA in Richtung 5'→3' Ende der DNA katalysiert.

Die in der Translationsreaktion hergestellte, synthetische mRNA wurde auf einem analytischen Ethidiumbromid-TBE-Agarosegel auf ihre Qualität hin überprüft.

Abbildung 27 RNA-Kontrollgel in Agarose



Die Länge der transkribierten RNA lag bei ungefähr 1,3 kb. Zur Kontrolle wurde der zur Transkription verwendete Vektor mit aufgetragen in das Agarosegel (Spur 1).

Der eingesetzte DNA-Vektor wurde anschließend durch Zusatz von RNase-freier DNase entfernt. Nach ca. 15 Minuten DNase-Verdauung war der linearisierte Vektor im Reaktionsansatz nicht mehr nachweisbar.

Die so hergestellte RNA wurde aufgereinigt. Zur Stabilisation der empfindlichen Substanz wurde RNasin hinzugefügt.

Vor der Injektion in *Xenopus* Oozyten wurde die Lösung abzentrifugiert, damit ungelöste Kristalle nicht das Aufziehen in die Glaskapillare stören; für die Verwendung im Kaninchen-Retikulozytenlysat wurde sie direkt eingesetzt.

Die fertigen Proben wurden nach der Reaktion eingefroren oder teilweise auch sofort weiterverarbeitet.

Eine erste Überprüfung der entstandenen Produkte wurde durch einen TBG-RIA (Radio-Immuno-Assay) vorgenommen nach der hausinternen Methode (Horn 1977). Hierbei zeigte sich bei allen Mutanten ein gutes Ergebnis, wenngleich auch die Menge an synthetisiertem Protein nur etwa einem Fünftel der Kontrolle (humanes Serum) entsprach (siehe Spalte „conc“).

	SEQ	PAT	CODE	TIME	CPM	CONC	UNIT	%CV
1	21	0	MEDIUM	60	5595.9	21.008		
	22	0	MEDIUM	60	5658.7	20.668		
	AVG.	0	MEDIUM		5627.3	20.838	µg/ml	1.2
2	23	0	MEDIUM	60	11703.7	4.064		
	24	0	MEDIUM	60	11892.5	OUT		
	AVG.	0	MEDIUM		11798.1	4.064	µg/ml	
3	25	0	MEDIUM	60	11585.2	4.282		
	26	0	MEDIUM	60	11620.6	4.216		
	AVG.	0	MEDIUM		11602.9	4.249	µg/ml	1.1
4	27	0	MEDIUM	60	11583.0	4.286		
	28	0	MEDIUM	60	12077.8	OUT		
	AVG.	0	MEDIUM		11830.4	4.286	µg/ml	
5	29	0	MEDIUM	60	11673.4	4.120		
	30	0	MEDIUM	60	11451.8	4.533		
	AVG.	0	MEDIUM		11562.6	4.326	µg/ml	6.8
6	31	0	MEDIUM	60	11520.4	4.403		
	32	0	MEDIUM	60	11475.7	4.487		
	AVG.	0	MEDIUM		11498.0	4.445	µg/ml	1.3
7	33	0	MEDIUM	60	11787.9	3.911		
	34	0	MEDIUM	60	11752.5	3.975		
	AVG.	0	MEDIUM		11770.2	3.943	µg/ml	1.1
8	35	0	MEDIUM	60	11897.9	OUT		
	36	0	MEDIUM	60	11860.2	OUT		
	AVG.	0	MEDIUM		11879.1	OUT	µg/ml	

Abbildung 28 RIA von TBG aus *Xenopus*-Oozyten

Spur 1: Kontrolle (Serum); 2-8: TBG aus Oozyten:

2 N-TBG
3 mGly1
4 mGly2
5 mGly3
6 mGly4
7 mGly5

8 Kontrolle (nur Wasser injiziert statt RNA)

Das kommerziell erhältliche Retikulozytenlysat von Kaninchen wurde zusätzlich mit ^{35}S -Methionin versetzt, damit die aus der gewünschten RNA synthetisierten Proteine radioaktiv markiert wurden. Damit das zu synthetisierende Protein ohne Signalpeptid und glykosyliert wurde, wurde zusätzliche mikrosomale Membranen (CMM) vom Hundepankreas hinzugefügt. Das entstandene Produkt wurde aber laut Hersteller und laut eigener Beobachtung im Lysat niemals vollständig glykosyliert.

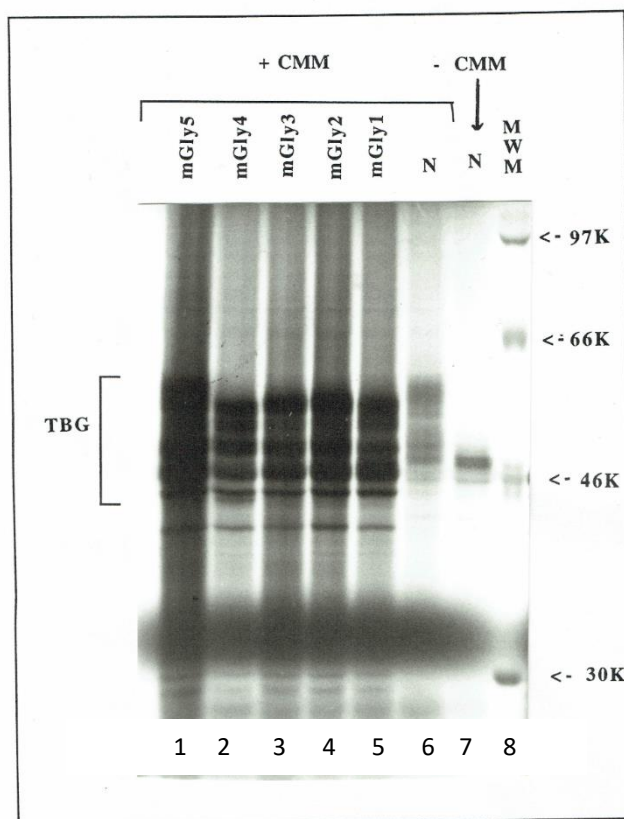
Als Kontrolle wurde parallel dazu das Enzym Luziferase hergestellt, die in Gegenwart von Sauerstoff Biolumineszenz zeigt, wenn das Molekül korrekt translatiert wurde.

Der technische Vorteil des Retikulozytenlysates ist die schnelle und einfache Herstellung kleiner Mengen des gewünschten Proteins; nachteilig ist vor allem die geringe Menge gewonnener Peptide, die für weitere Untersuchungen nicht ausreicht, die Verunreinigung mit den Proteinen der Retikulozyten sowie der relativ hohe Preis der Reagenzien. Größere Mengen an reifem Protein wurden besser und preiswerter durch Injektion der RNA in *Xenopus* Oozyten gewonnen.

Die Analyse der synthetisierten Proteine erfolgte anschließend über ein SDS-PAGE.

Als Größenmarker diente hierbei der ^{14}C -Rainbow-Marker.

Das fertige SDS-Gel wird auf Whatmanpapier aufgezogen, getrocknet und auf BioMax-Film exponiert.



: SDS-PAGE eines ^{35}S -Methionin-markierten Retikulozytenlysates
CMM (canine microsomal membranes);
N Normal-TBG;
mGly1 mutiertes TBG ohne Glykoslierungsstelle 1;
mGly2 mutiertes TBG ohne Glykoslierungsstelle 2;

v.l.n.re.: Spur 1- 6 mit CMM:
1 mGly5
2 mGly4
3 mGly3
4 mGly2
5 mGly1
6 N-TBG (= Wildtyp)
7 N-TBG ohne CMM
8 Proteingewichtsmarker (MWM)

Abbildung 29 SDS-PAGE eines Retikulozytenlysates

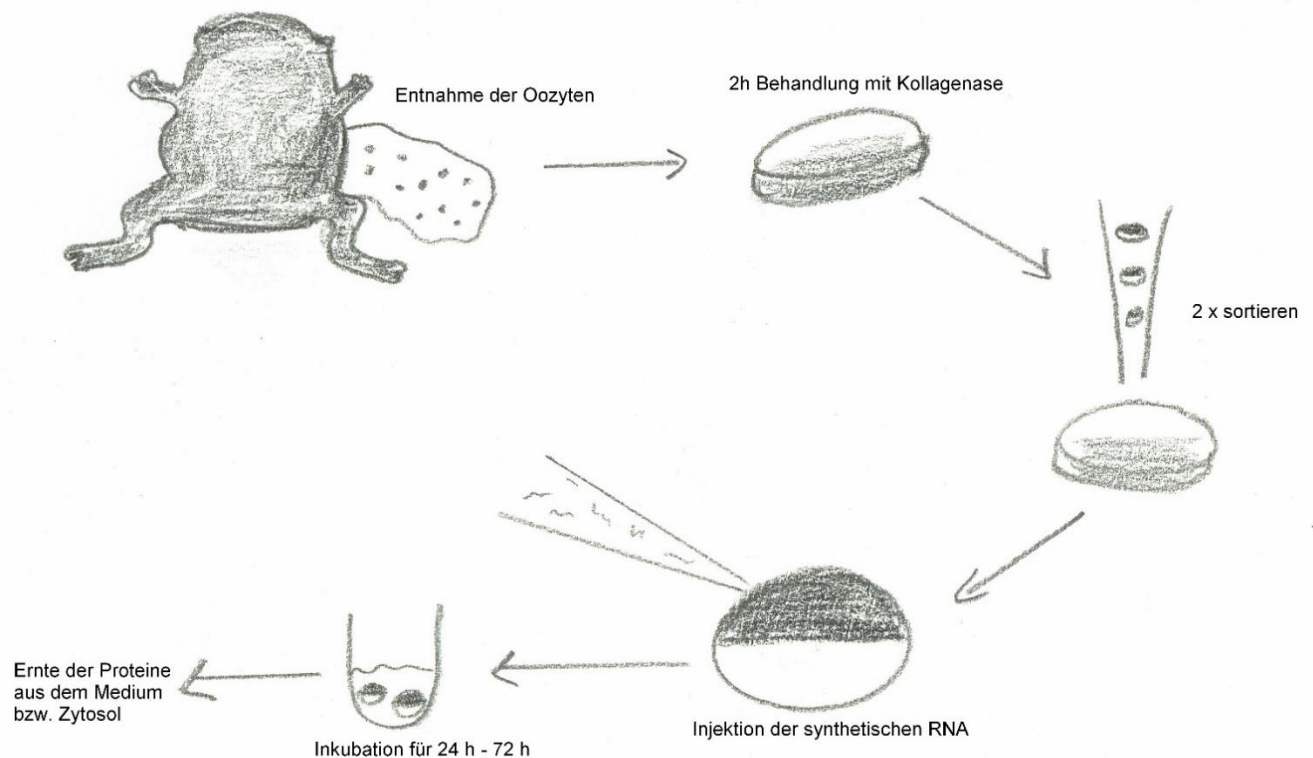
Im SDS-PAGE eines Retikulozytenlysates sah man beim normalen TBG sechs Banden, mit und ohne Signalpeptid sowie nicht-glykosyliertes und ein- bis vierfach glykosyliertes. Den Unterschied zwischen TBG mit und ohne Signalpeptid sah man beim TBG kaum. Deutlich erkennbar ist der Größenunterschied zwischen den Mutanten und dem Normal-TBG: Die *in vitro* dargestellten TBG-Mutanten mGly1, 2, 3 und 4 sind um ca. 2 bis 3 kDa kleiner als das Normal-TBG, was in etwa dem Gewicht einer fehlenden Kohlenhydratkette entspricht. Die Mutante mGly5 verhält sich dagegen im SDS-PAGE wie das unveränderte Protein.

3.3.2 *In vitro*-Translation: *Xenopus laevis* - Oozyten

Ein anderes System zur Expression von eukaryotischen Proteinen ist die Injektion von synthetischer RNA in die Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*. *Xenopus laevis* lebt rein aquatisch bei 18 bis 20° C und ist an sich unkompliziert in der Haltung. Gefüttert wurden die Tiere mit Protein-reichem Trockenfutter, roher Leber oder tiefgekühlten rote Mückenlarven, die von den Tieren gerne angenommen wurden. Die in reifen Oozyten von *Xenopus laevis* produzierten Proteine werden vollständig glykosyliert, prozessiert und ins umgebende Medium sezerniert, soweit die entsprechenden Strukturen in der synthetischen RNA vorhanden sind. Für die *in vitro*-Expression von TBG hat das *Xenopus*-System außerdem den Vorteil, dass die Eier in einer schwach salzigen Lösung mit nur ein wenig HEPES-Puffer gehalten werden können, ohne jede Zugabe von Serum oder anderen komplexen Medien, wie sie in der Zellkultur verwendet werden müssen. Da es sich beim TBG um ein Serumprotein handelt, dessen Ligand T₄ auch an andere Serumproteine bindet, war das aus *Xenopus* gewonnene Protein aufgrund seiner Reinheit ideal für Bindungsassays und Scatchardanalysen, bei denen Serumzusätze erheblich gestört hätte.

Die Eier wurden den Tieren in Narkose nach einem Bauchschnitt entnommen. Dazu betäubte man das Tier zunächst. Dann wurde ein etwa 1 cm großer Schnitt mit einem Skalpell durch das Integument geführt, ein zweiter durchtrennte die Bauchdecke. Darunter sind dann bei einem fruchtbaren Tier bereits die Eier sichtbar, die mit einer Pinzette vorsichtig herausgezogen werden konnten, da alle im Eisack zusammenhängen. Das Ovar wurde mit einem chirurgischen Faden abgebunden und der Faden wurde verknotet. Dann wurde der Eiersack hinter der Naht abgeschnitten und die Oozyten in eine lichtgeschützte Petrischale mit Medium überführt.

Abbildung 30 Expression von Proteinen durch Injektion von sRNA in *Xenopus*-Oozyten



Peritoneum und Integument wurden je nach Größe des Schnittes einzeln mit zwei bis drei Stichen genäht. Das Tier wurde in ein kleines Frischwasserbecken gesetzt, wobei darauf zu achten war, dass die Atemöffnungen über Wasser blieben, da das noch betäubte Tier sonst erstickt wäre. Nach dem Aufwachen wurde es unter Beobachtung zu den Anderen gesetzt. Das Ovar blieb bei dieser Operation vollständig erhalten und die Eier konnten innerhalb von 4-6 Wochen nachwachsen. Einem erwachsenen Tier konnten so mehrmals Eier entnommen werden, da sich nach der ersten Operation alle Eier ungefähr im gleichen Reifestadium befanden, was das Sortieren und die Injektion erheblich erleichterte.

Ein geschlechtsreifes *Xenopus*-Weibchen enthält bis zu 30000 Oozyten, von denen ca. ein- bis dreitausend ausgereift sind. Diese sind über einen Millimeter groß und waren daher unter dem Mikroskop leicht zu handhaben. Sie besitzen einen hellen, vegetativen Pol und einen dunklen, animalischen Pol, unter dem der Zellkern liegt.

Nach der Eientnahme wurden die Oozyten in einem geeigneten Medium aufbewahrt. Das aus der Narkose erwachte Tier konnte sofort wieder ins Aquarium zurückgesetzt werden. Eine Behandlung mit Kollagenaselösung entfernte die Eihüllen. Danach wurden die Oozyten unter einem Mikroskop sortiert.

Eine frisch gezogene Kapillare wurde im Binokular mit einer Feinpinzette so gebrochen, dass eine abgeschrägte Spitze mit einem Durchmesser von ca. 20 μm entstand.

Dann wurde RNase-freies Mineralöl mit einer Kanüle in die Glaskapillare luftblasenfrei

eingefüllt und die Kapillare auf den Stempel des Microdispensers aufgesteckt. Die RNA wurde in die Glaskapillare aufgezogen und anschließend äquatorial in Richtung des Zellkerns injiziert. Dabei konnten immer ungefähr 100 Eier injiziert werden. Die Eier wurden drei Stunden lang auf Eis im Dunklen kühl gestellt, um ein besseres Verschließen der Injektionswunde zu erreichen. Danach wurden die nachsortierten, noch intakten Eier in Kulturschalen überführt und im Dunklen inkubiert. Das Medium enthielt zusätzlich Natriumpyruvat, das den Eiern als Energiequelle diente.

Die Oozyten produzierten ca. 6 Stunden nach der Injektion das gewünschte Protein. Das Maximum wurde 48 h bis 72 h später erreicht.

Da TBG ein sezerniertes Protein ist, sollte es in das Medium abgegeben werden und somit durch täglichen Medienwechsel geerntet werden können. Dies gelang zum Teil über mehr als eine Woche hinweg. Eine radioaktive Markierung der synthetisierten Proteine wurde erreicht durch die Zugabe von ^{35}S -Methionin ins Medium, die idealerweise ab ca. 24 h nach der Injektion begann. Bei jedem Mediumwechsel, der normalerweise im 24 h-Rhythmus durchgeführt wurde, wurde neues ^{35}S -Methionin zugesetzt.

Zur Untersuchung der Proteine wurde ein T_4 -Bindungstest zur schnellen Quantifizierung durchgeführt, eine Scatchard-Analyse zur exakten Bestimmung der Bindungsaffinität und ein SDS-PAGE zum quantitativen und qualitativen Nachweis der Synthese. Ursprünglich war noch eine Immunopräzipitation zur Überprüfung von Oberflächenstrukturen und isoelektrische Fokussierungen zur Analyse der Mikroheterogenität der Zuckerstrukturen angedacht, jedoch erwiesen sich die *in vitro* hergestellten Mengen der mutierten TBG-Moleküle als eine zu geringe Menge an Protein, um dies durchführen zu können.

3.3.3 Analyse der exprimierten Proteine durch Elektrophorese (SDS-PAGE)

Im Retikulozytenlysat oder in *Xenopus* Oozyten synthetisiertes ^{35}S -markiertes TBG wurde nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970) durch denaturierende, diskontinuierliche, vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach dem Molekulargewicht aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt.

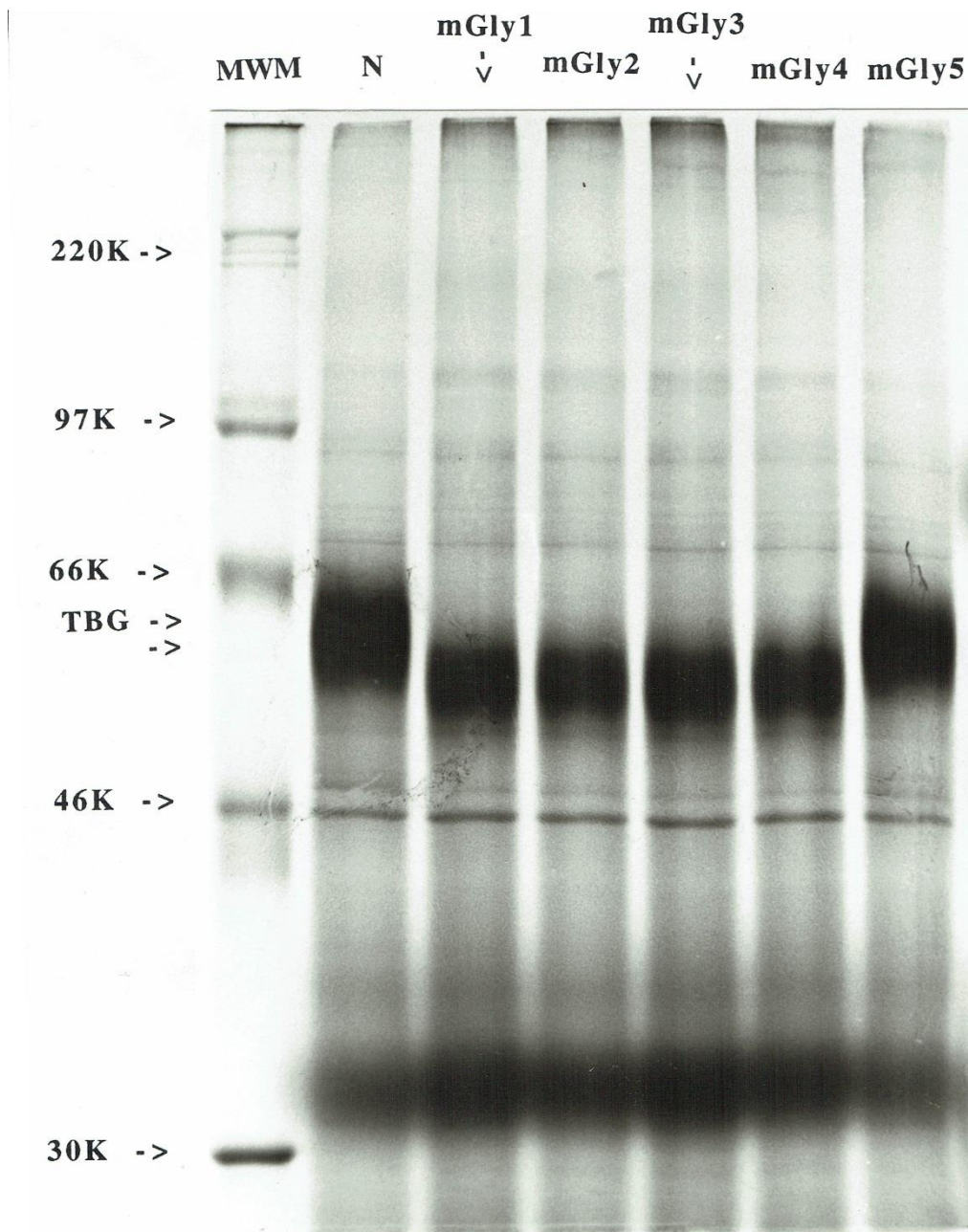
Als Kontrolle diente *in vitro*-synthetisiertes Normal-TBG, das vom Mutagenese-Ausgangsvektor pSpT-28 kodiert wurde.

Die durch β -Mercaptoethanol denaturierten Proteine wurden durch Zusatz von SDS komplexiert, erhielten dadurch eine negative Nettoladung und wurden im SDS-PAGE nur nach ihrer Größe aufgetrennt. Im grobporigen Sammelgel wurden die Proteine durch die spezifischen Eigenheiten des Sammelgelpuffers konzentriert. Im feinporigeren Trenngel, dessen Puffer sich im pH-Wert von dem des Sammelgels unterschied, erfolgte die eigentliche elektrophoretische Auftrennung. Eine wichtige Rolle bei der Konzentration der Proben im Sammelgel spielten die im Laufpuffer vorhandenen Glycinmoleküle und Chloridionen im Zusammenspiel mit den verschiedenen pH-Werten (s.a. SDS-PAGE nach Laemmli (Laemmli 1970)).

Nach Beendigung der Elektrophorese konnten die radioaktiv markierten Proteine nach Trocknung über Exposition auf Röntgenfilmen nachgewiesen werden. Wichtig war hierbei,

immer den für die jeweilige Nachweismethode geeigneten und ggf. radioaktiv markierten Proteingrößenstandard mit aufzutragen. Als Größenmarker wurde wie beim SDS-PAGE von Proteinen aus Retikulozytenlysate ^{14}C -Rainbowmarker verwendet.

Abbildung 31 SDS-PAGE von TBG aus dem Medium von *Xenopus* Oozyten



Das Methionin wurde 24 nach der Injektion der sRNA zugegeben und weitere 24h später geerntet.

v.li.n.re.: MWM (^{14}C -Rainbow-Marker), N normal-TBG, Mutanten mGly1 bis mGly5

Von den radioaktiv markierten Proteinen aus den *Xenopus* Oozyten - Medien wurde ein SDS-PAGE durchgeführt (s. Abb. S. 46 und 47).

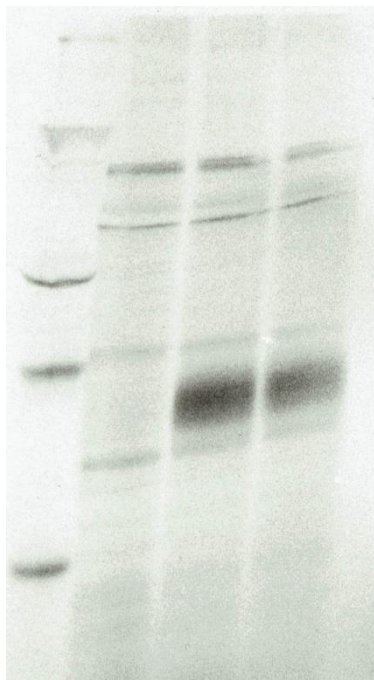


Abbildung 32 SDS-PAGE von *Xenopus*-exprimiertem TBG N und mAllGly

- 1 Molekulargewichtsmarker
- 2 TBG-Mutante mAll-Gly (ohne Glyk.stellen) aus XO
- 3 N-TBG
- 3 mGly1-TBG

1 2 3 3

Die Analyse dieser SDS-PAGEs lassen folgende Schlüsse zu:

1. Alle Glykosylierungsmutanten werden in den Oozyten in der gleichen Menge synthetisiert wie der Normaltyp; die fehlende Glykosylierung beeinflusst also in keiner Weise die Stärke der Expression der Proteine.

2. Das normal-TBG und die Mutante mGly5 hatten das gleiche Molekulargewicht. Die Mutanten mGly1 bis mGly4 sind auch in diesem Zellsystem ein Stück kleiner, die Mutante mGly5 nicht. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass zum einen die letzte, fünfte N-Glykosylierungsstelle in vivo nicht benutzt wird.

Dies entspricht auch der Prognose der theoretischen Vorhersagen aus den Datenbankanalysen der Serpine im Labor von Prof. Huber und konnte hiermit experimentell bewiesen werden.

3. Es handelt sich immer um die gleiche Glykosylierungsstelle des TBG-Moleküls, mGly5, an die in beiden in vivo - Systemen keine Kohlenhydratreste angehängt werden.

4. Eine Mutante, die überhaupt keine Glykosylierungsstelle mehr enthielt, konnte im Oozytensystem kein TBG ins Medium sezernieren (Abb. 32). Hieraus kann man schließen, dass die Glykosylierung für die Sezernierung ins umgebende Medium zwingend notwendig ist.

3.3.4 Analyse durch T₄-Bindungsassay

Zur Quantifizierung der aus *Xenopus* gewonnenen Proteinmenge an TBG eignete sich am besten ein T₄-Bindungsassay. Hierbei wurde eine definierte Menge des Oozytenmediums zu

125J-markiertem T4 gegeben, und nach Inkubation wurde das nicht gebundene T4 durch Zugabe von Anionenaustauscherharz wieder entfernt.

Als Standard dienten drei Verdünnungen eines Kontrollserums, das zuvor im Routinelabor der Klinik bestimmt worden war.

Zur Bestimmung der Proben wurden 50 µl oder 100 µl des Oozytenmediums eingesetzt. Zwei Röhrchen bleiben Protein-frei zur Bestimmung der Gesamtrate an Zerfällen und des Leerwertes.

Die Messung erfolgt in einem für 125I-Zerfälle eingestellten Gamma-Counter.

Verwertbare Expressionsversuche in *Xenopus* Oozyten ergeben Counterwerte im Bereich ab 10000 Zerfälle pro 100 µl eingesetzter Probe, der Leerwert sollte 2000 nicht übersteigen, die Gesamtzerfälle lagen bei frischer Radioaktivität über 90000.

Das Standardserum ergab in der Verdünnung Konz. 1 µl mindestens 20000 Zerfälle.

Probe	Ka	Menge (fmol)	Datum
S	9,2 E+9	147,00	
N	2,2 E+10	60,00	22.12.1995
1	3,2 E+9	39,00	22.12.1995
2	2,1 E+10	59,40	22.12.1995
3	2,9 E+10	68,80	22.12.1995
4	1,7 E+10	71,50	22.12.1995
5	3,5 E+9	78,40	22.12.1995
S	2,1 E+10	85,00	22.12.1995
S	3,6 E+9	270,00	12.01.1996
N	9,5 E+9	69,00	18.04.1996
1	9,6 E+9	151,00	18.04.1996
5	4,4 E+9	1381,00	18.04.1996
S	1,6 E+10	105,70	18.04.1996
N	5,3 E+9	132,80	06.06.1996
3	1,4 E+10	123,40	06.06.1996
			06.06.1996

Abbildung 33 Vergleich der Bindungsaffinitäten

Vergleich der Bindungsaffinitäten verschiedener Proben von unterschiedlichen Proben Tagen (S Kontrollserum, N Normal-TBG, 1 – 5 mGly-Mutanten)

Wie man gut sehen kann schwankten die Werte stark, da allein schon die Froscheier in ihrer Qualität oft sehr unterschiedlich waren.

Um die fünf Mutanten mit dem Wildtyp-TBG zu vergleichen, wurden daher nur Proteine aus der gleichen Charge an Eiern und RNA verwendet und miteinander im gleichen Ansatz gemessen (siehe nächste Abbildung):

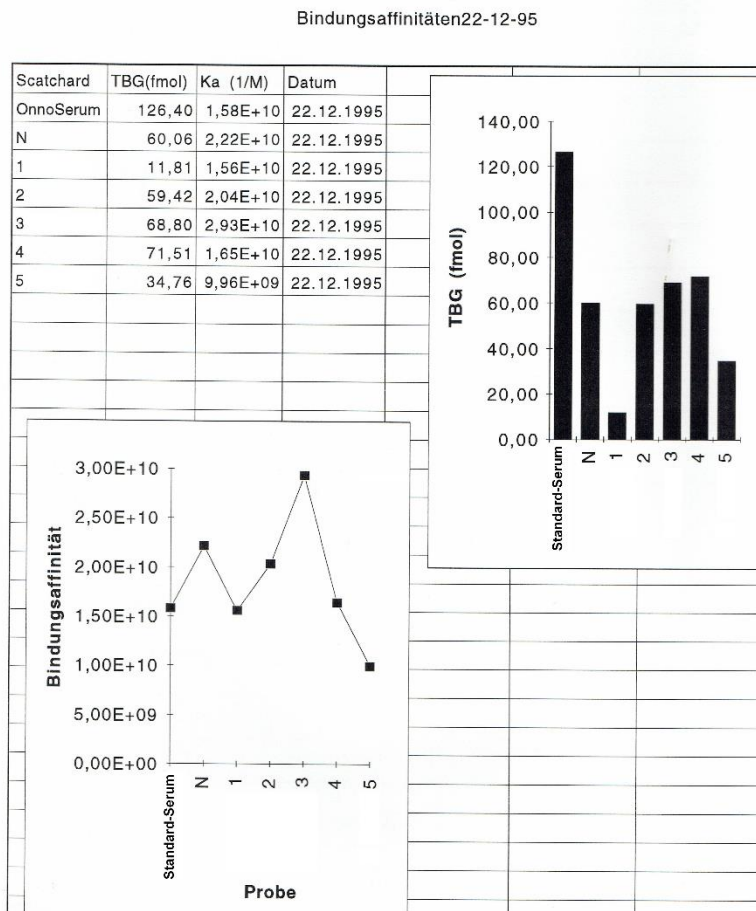


Abb. oben: Vergleich von N-TBG (= Wildtyp) und Glykosylierungsmutanten (1-5) aus einer Produktionscharge. Man erkennt deutlich die starken Schwankungen der TBG-Mengen aus den Xenopus-Eiern.

Abbildung 34 Vergleich von N-TBG und Glykosylierungsmutanten 1-5

3.5.3 Scatchard-Analyse

Zur exakten Bestimmung der Bindungsaffinität der zu untersuchenden Proteine wurde eine Bindungsanalyse nach der Methode von Scatchard (Berg 2012) durchgeführt. Alle in einer Scatchard-Analyse zu bestimmenden Proben mussten im gleichen Messbereich des Bindungstests liegen, um die Ergebnisse korrelieren zu können.

In einer Verdünnungsreihe verdrängt man das ^{125}J -markierte T_4 durch steigende Mengen an kaltem T_4 . Hierfür benötigte man allerdings mindestens 200 fmol TBG (Normal-TBG bzw. TBG mit einer dem Normaltyp entsprechenden Bindungsaffinität). Nach der Methode von Scatchard lässt sich dann die Bindungsaffinität bestimmen, indem man das gebundene T_4 gegen den Quotienten gebundenes/freies T_4 aufträgt. Man konnte sie aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der X-Achse die Bindungsaffinität der Probe zum T_4 ablesen.

Vor der Durchführung einer Scatchardanalyse wurde daher ein T_4 -Bindungstest durchgeführt, um eine Quantifizierung der Proben zu erreichen und um sicherzustellen, dass die Scatchard-Analyse innerhalb des Messbereiches lag.

Kontroll-Oozyten wurden mit RNA vom Normaltyp-TBG (pSpT-28) injiziert und ebenfalls in der Scatchard-Analyse mitbestimmt.

Die in der Scatchard-Analyse eingesetzten Proben sollten pro Röhrchen (!) des Tests mindestens von 10000 Zentrifugenröhrchen äquivalentes Protein aus dem T_4 -Bindungstest enthalten, um im linearen Messbereich zu bleiben. Das bedeutet, für einen Scatchard mit 10 Messpunkten waren mindestens 1,1 ml abgenommenes Medium notwendig, das im Bindungstest 10000 counts/100 μ l Medium enthielt.

Von den abgenommenen Medien der injizierten Oozyten wurde dann jeweils ein T_4 -Bindungsassay zur schnellen Quantifizierung des TBG durchgeführt sowie danach eine Scatchardanalyse zur exakten Bestimmung der Bindungsaffinität. Die im Bindungsassay vermessenen Proben wurden so eingesetzt, dass die Proteinmenge im linearen Bereich der Scatchard-Analyse lag.

Abb.: Scatchard-Analyse des Normal-TBG und der Mutanten.

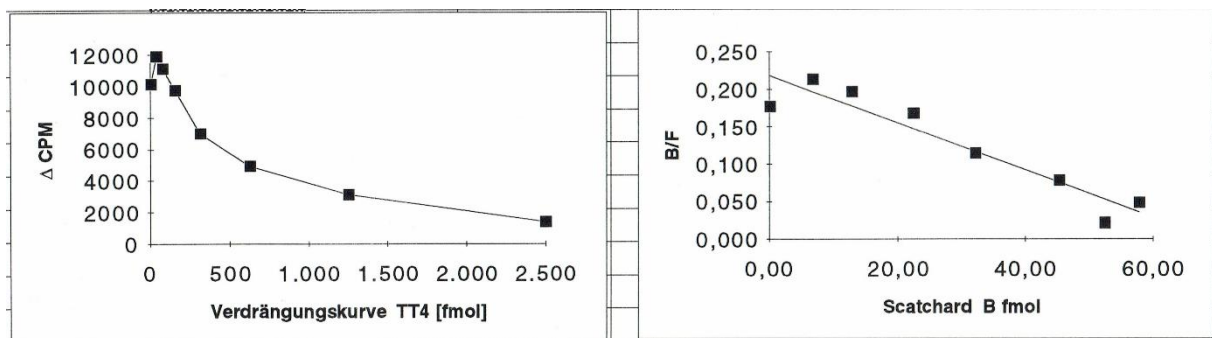


Abbildung 35 Scatchard-Analyse des Normal-TBGs aus Xenopus-Oozyten

links: Y-Achse Zerfälle pro Minute; rechts: X-Achse: gebundenes T_4 , Y-Achse: gebundenes zu freiem T_4

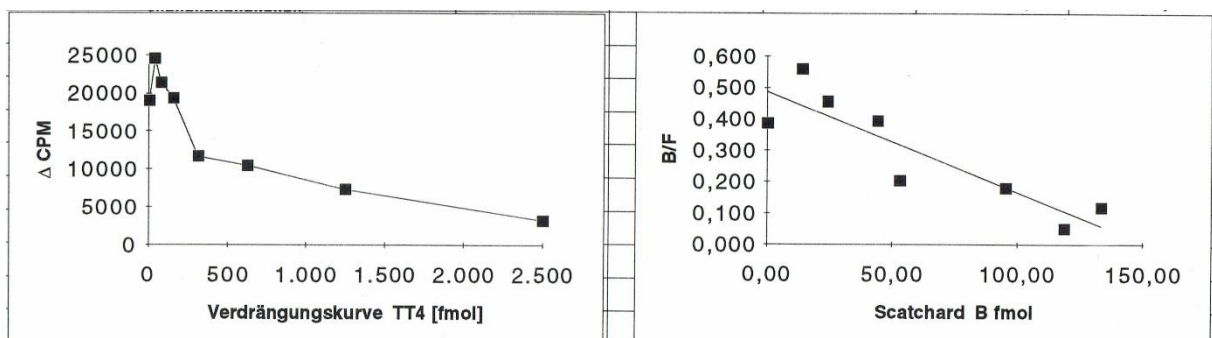


Abbildung 36 Scatchard-Analyse der Mutante mGly1-TBG aus Xenopus Oozyten

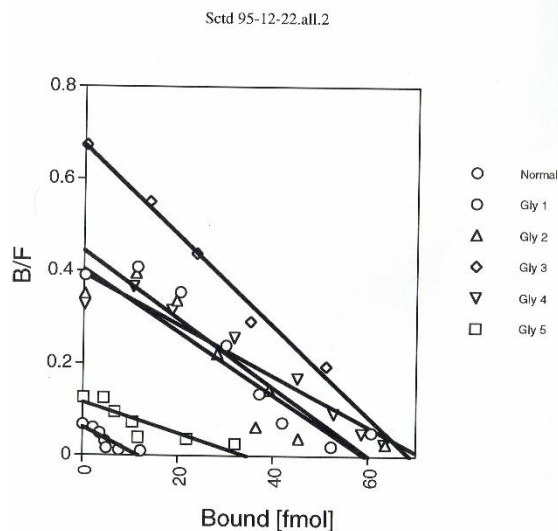


Abbildung 37 Scatchard-Analyse aller fünf Mutanten und des Wildtyp-TBGs („Normal“)

Leider lässt sich feststellen, dass es letzten Endes trotz des großen zeitlichen und experimentellen Aufwandes nicht gelang, genug Probenmaterial der mutierten TBG-Moleküle in annähernd vergleichbarer Menge zu erzeugen, so dass sich die exakte Bindungsaffinität der einzelnen Mutanten nicht exakt genug und reproduzierbar feststellen lies. Der Scatchard-Plot lieferte jedoch insoweit sehr brauchbare Ergebnisse, als man anhand der Verdrängungskurven feststellen konnte, dass sich die Mutanten nicht in ihrer Bindung zum T_4 an sich unterschieden; alle Verdrängungskurven waren mit der des Normaltyps vergleichbar.

Die wesentliche und auch sehr eindeutige Aussage stammt letztlich vom SDS-Page der TBG-Mutanten, aus dem man klar erkennen konnte, dass die letzte der fünf Glykosylierungsstellen nicht verwendet wird und die Glykosylierung für den Export aus der Zelle notwendig ist. Somit sind die Positionen 1 - 4 *in vivo* in Benutzung und eine irgendwie vorhandene Glykosylierung unbedingt notwendig für den Export. Welche Position dabei glykosyliert wird ist dabei offensichtlich für das System Zelle in keiner Weise von Bedeutung.

4 Diskussion

Die interessante Frage, welche Auswirkungen die Glykosylierung auf die Faltung und Funktion eines Proteins hat, wurde hier mit verschiedenen Methoden untersucht, die zunächst diskutiert werden sollen.

Anschließend geht es um die inhaltlichen Aussagen und ihre Konsequenzen.

Das Ziel dieser Arbeit war, das TBG-Gen so zu verändern, dass es durch Austausch einer Aminosäure gegen eine andere Aminosäure gezielt eine (oder mehrere) der potentiellen Glykosylierungsstellen nicht mehr enthält.

Zur Veränderung der DNA-Sequenz wurde ein bakterielles System verwendet. Die gerichtete Mutagenese mit dem bakteriellen Vektor pSelect© funktioniert sehr gut und erzeugt mit hoher Ausbeute die Einzelmutationen. Auch die Kontrolle durch gleichzeitige Reparatur der Ampicillinresistenz durch eine zweite Mutagenese im gleichen Ansatz hat hervorragend funktioniert. Nicht durchführbar war dagegen ein Mutageneseansatz, der sowohl die Ampicillinresistenz wiederherstellen sollte wie auch gleichzeitig alle fünf

Glykosylierungsstellen entfernen sollte. Eine Mutagenesereaktion, die sechs Stellen in der DNA gleichzeitig verändert, war nie erfolgreich. Daher musste diese Mutante letztlich durch konventionelles Schneiden mit geeigneten Restriktionsenzymen und anschließendem Ligieren geeigneter Einzelstücke der Einzel-Gly-Mutanten erzeugt werden. Ein Vorteil des pSelect-Systems ist die Verwendbarkeit in *E. coli*-Bakterien als Wirte, da diese einfach zu handhaben sind und schnell wachsen. Es war immer in kurzer Zeit möglich, sehr große Mengen an Plasmiden als DNA-Vorlage für die gewünschte RNA zu produzieren. Weitaus größere Schwierigkeiten bereitete die daraus herzustellende RNA und ihr Handling.

Ein grundsätzliches Problem war das Stabilisieren der RNA, da der Mensch die größte Quelle für RNAsen darstellt. Kontaminationen sind schwer zu vermeiden. Durch technische Aufwände sowie den Zusatz von teurem RNasin, das vorhandene RNAsen inhibiert, war es dann letztlich möglich, RNA in reproduzierbaren Mengen herzustellen. Die Ergebnisse wären vermutlich besser gewesen, wenn eine Sterilbank vorhanden gewesen wäre. Auch die schwankende Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit erschwerte dem Umgang mit den empfindlichen RNA-Molekülen. Dies war allerdings zu Beginn der Experimente nicht absehbar. Die Quantifizierung der RNA war nur mit relativer Unschärfe möglich, so dass man nie sagen konnte, wie viel RNA pro Eizelle exakt injiziert wurde.

Der Einsatz von *Xenopus laevis*-Oozyten hat sehr viele Vorteile bei der Expression von eukaryotischen Proteinen, da es sich um ziemlich stoffwechselinaktive Zellen handelt. Daher stellen sie das gewünschte Protein nach der Injektion der RNA schnell, praktisch rein und in großen Mengen her. Sie sezernieren das Protein vollständig glykosyliert ins Medium, und es kann dort sehr einfach geerntet werden. Das Medium ist sehr rein, da es lediglich Pyruvat in einer schwach salzigen Lösung enthält. Die Bindung an den natürlichen Liganden T_4 ist mit dem synthetischen TBG auch nachweislich gelungen. Da es sich beim TBG um ein Serumprotein handelt, dessen Ligand T_4 auch an andere Serumproteine bindet, ist das aus *Xenopus* gewonnene Protein aufgrund seiner Reinheit sogar ideal für Bindungsassays und Scatchardanalysen, bei denen Serumzusätze, die für andere Expressionssysteme wie

Säugetierzellen notwendig gewesen wären, erheblich stören würden. Der Krallenfrosch *Xenopus laevis* lebt rein aquatisch bei 18 bis 20°C und ist an sich nicht kompliziert in der Haltung. Probleme traten aber immer wieder durch wechselnde Wasserqualitäten auf z.B. durch Chlorierungsmaßnahmen der Stadtwerke im Hochsommer. Diese konnten durch Einführung eines Wasseraufbereiteters zum Frischwasser vermieden werden. Auch wurden durch Neuankömmlinge gelegentlich Infektionen eingeschleppt, die deshalb immer zwei Wochen in Quarantäne gehalten wurden. Die Haltung in großen Kunststoffbecken ohne Bodengrund, Pflanzen und Rückzugsmöglichkeiten bedeutete für die Tiere zusätzlichen Stress, der sicher einen negativen Einfluss auf die Fruchtbarkeit hatte. Die Qualität der Oozyten schwankte immer wieder: es gab Chargen, die sehr viel Protein produzierten, und solche, die optisch zwar gleich gut wirkten, von denen aber ein hoher Teil nach der Injektion der RNA aufplatzte oder rasch abstarb. Im Gegensatz zur RNA-Produktion, bei der die Qualitätsschwankungen letztlich in den Griff zu bekommen waren, gelang es hier nur mittelmäßig befriedigend, ein stabiles Expressionssystem mit reproduzierbaren und vor allem quantitativ vergleichbaren Ergebnissen zu etablieren. Daher konnten auch keine wirklich vergleichbaren Mengen an TBG aus ein und derselben Injektionsreihe von Oozyten gewonnen werden, was wiederum eine Voraussetzung für weitere Feinanalysen, z.B. durch isoelektrische Fokussierungen, gewesen wäre.

Ein großer Vorteil der verwendeten Methoden war die etablierte Labordiagnostik, die im Labor der Innenstadtlinik vorhanden war und der etablierte Standard für die Messungen der Schilddrüsenhormone. Dies erleichterte die Analyse der Forschungsergebnisse erheblich, da die routinemäßigen Laboruntersuchen der Klinik als Referenzen genommen werden konnten.

Zu den inhaltlichen Aussagen dieser Forschungen:

Verwendete Glykosylierungsstellen *in vivo*

In der Primärstruktur des TBGs mit 44 kDa Größe sind fünf Erkennungssequenzen für Glykosylierungen vorhanden, wobei diese Zuckerketten zusätzlich 20% des Gewichtes ausmachen; das reife TBG wiegt 54kDa. Bei allen Serpinen außer beim CBG werden *in vivo* stets weniger Glykosylierungsstellen benutzt als tatsächlich in der Primärstruktur vorhanden sind. Datenbankrecherchen zur Glykosylierung von potenziellen Konsensus-Sequenzen zu Beginn dieser Arbeit hatten ergeben, dass die letzte, am C-Terminus gelegene Glykosylierungsstelle oft *in vivo* nicht verwendet wird. Außerdem reduziert die Nachbarschaft eines Prolins die Wahrscheinlichkeit ebenfalls stark, dass Asparagin glykosyliert wird: bei 22,9% der nicht-glykosylierten Stellen ist in der Sequenz "Asn - X - Ser/Thr - Y" das X oder Y ein Prolin. Diese Beobachtungen erlauben eine Vorhersage von *in vivo* glykosylierten N-Konsensus-Sequenzen mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit. Der Umkehrschluss ist jedoch weitaus schwieriger, da offenbar noch nicht alle beteiligten Faktoren bekannt sind, die einen Einfluss auf die N-Glykosylierung bzw. die nicht-Glykosylierung von vorhandenen Konsensus-Sequenzen haben. Daher können nur 25% der nicht-verwendeten Stellen anhand der Primärstruktur vorhergesagt werden. Weitere Korrelationen zur Häufigkeit von benachbarten Aminosäuren und deren möglichem Einfluss

konnten bislang nicht festgestellt werden. 90% aller möglichen N - Glykosylierungsstellen der analysierten Proteine werden *in vivo* tatsächlich verwendet. Bei allen untersuchten Glykoproteinen, inklusive zytoplasmatischer Proteine, kommt in der Konsensus-Sequenz Serin genauso häufig vor wie Threonin. Die Sequenz Asn - X - Thr wird in 65,7% der untersuchten Moleküle N-glykosyliert, Asn - X - Ser in 33,6%. Bei den nicht glykosylierten Stellen sind beide fast gleich häufig vertreten, Asn - X - Thr mit 52,1% und Asn - X - Ser mit 47,9%.

Aus diesen Vorüberlegungen ergab sich, dass es wahrscheinlich ist, dass auch beim TBG die gleichen Glykosylierungsstellen wie bei den verwandten Serpinen benutzt werden, und möglicherweise die dem C-Terminus am nächsten gelegene nicht verwendet wird (*Quelle: Eigene Recherchen in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Onno E. Janßen und der Arbeitsgruppe Prof. R. Huber, Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried München*).

Mit den hier vorliegenden Ergebnissen konnte klar nachgewiesen werden, dass tatsächlich die letzte der fünf Konsensus-Sequenzen *in vivo* nicht glykosyliert wird, wie es der theoretische Vergleich schon vorhergesagt hatte, da alle anderen Mutationen ein leichteres TBG-Molekül ergaben, nur die Mutante mGly5 hatte das gleiche Molekulargewicht wie das normale TBG.

Auswirkungen auf Faltung und Sekretion

Nach Untersuchungen von Murata (Murata Y 1986) schien der Kohlenhydratanteil des TBG für die korrekte Faltung und Sekretion des Moleküls verantwortlich zu sein (Murata, Magner et al. 1986). Diese Untersuchungen ergaben jedoch ein anderes, etwas differenzierteres Bild, insbesondere in Bezug auf die Faltung des Proteins. Murata et al. (Murata Y 1986) gingen bei ihren Arbeiten von einer hepatischen Krebszelllinie aus, die TBG sezerniert. Sie verwendeten Tunicamycin, um die Glykosylierung gezielt zu inhibieren, sowie isotope-markiertes Methionin, Mannose und Glucosamin, um die Produkte mittels SDS-PAGE und über spezifische Antikörper nachzuweisen. Sie konnten zeigen, dass das nicht-glykosylierte TBG nicht sezerniert wurde. Dies entspricht auch den hier vorliegenden Ergebnissen. Die Schlussfolgerung, dass nicht glykosyliertes TBG grundsätzlich nicht korrekt gefaltet ist, lässt sich anhand der vorliegenden Untersuchungen aber so nicht halten. Alle vier Einzelmutanten des TBGs, die jeweils eine unterschiedliche Glykosylierungsstelle nicht mehr trugen, wurden ebenso sezerniert und banden das T₄ wie das normale TBG.

Hätte die Glykosylierung einen großen Einfluss auf die Faltung der Tertiärstruktur, so sollte man einen Unterschied zwischen diesen Mutanten erwarten, sowohl gegenüber dem normalen TBG wie auch eventuell untereinander. Die genaue Auswertung der beschriebenen Expressionsexperimente durch SDS-PAGE, T₄-Bindungsassays und Scatchard-Analysen führte zu dem Schluss, dass die unterschiedlichen Mutanten KEINE signifikante Änderung in ihrer Bindungsaffinität zum T₄ haben, d.h. alle Glykosylierungs-defekten Proteine müssen korrekt gefaltet sein, da sonst die Funktionalität geändert wäre. Auch aus sterischen Überlegungen ergibt sich, dass es einen deutlichen Unterschied ausmachen müsste, welcher der vier Zuckerketten fehlt, die jede für sich allein schon 5% des Gesamtgewichtes ausmachen. Zusätzlich würden sich aufgrund der hohen spezifischen Bindungsaffinität zum T₄ und der komplexen Struktur-Wechselwirkungen in der Bindungstasche des TBG kleinste Änderungen

in der räumlichen Anordnung mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit sofort bemerkbar machen (vgl. Abb. 15 Seite 28). In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass nur **irgendeine** Glykosylierung notwendig ist für den Export des reifenden Proteins ins Medium; sobald das Molekül Zuckerketten trägt, wird es sezerniert, egal, welcher der Zuckerketten tatsächlich fehlt.

Ein schon länger bekannte Variante, TBG-Gary, wird durch eine Punktmutation verursacht, die zu einer zusätzlichen Glykosylierung im Molekül führt (Y. S. Mori 1989). Dies führte zu einer deutlich reduzierten Bindungsaffinität für T_4 ; es gibt jedoch eine Reihe von Möglichkeiten, wodurch diese verursacht werden könnte. Die zusätzliche Zuckerkette könnte beispielsweise die Bindungsstelle sterisch behindern, den Zugang zur Bindungstasche blockieren oder ähnliches.

Bei den Voruntersuchungen von Murata wurden Antikörper zum Nachweis der Produkte eingesetzt, aber diese können prinzipiell nur Oberflächenepitope erkennen und binden. Das T_4 wird aber innerhalb des TBGs in einer Art Tasche gebunden, dessen Struktur auch ohne Zuckerketten funktionieren kann. Die Funktionalität der synthetisch entstandenen Proteine kann mit Antikörpertests nicht überprüft werden; in dieser Arbeit konnte sie durch T_4 -Bindungsassay und Scatchard-Plots klar belegt werden. Auch der Einsatz von Tunicamycin ist zu hinterfragen. Tunicamycin inhibiert die GlcNAc-Phosphotransferase (GPT), die den Transfer von N-acetylglucosamine-1-phosphate von UDP-N-Acetylglucosamin zum Dolicholphosphat im ersten Schritt der Synthese von Glykoproteinen katalysiert (Taylor. M. 2011). Zellen, die mit Tunicamycin behandelt werden, können überhaupt keine Glykoproteine mehr synthetisieren. Aus Untersuchungen an Knockout-Mäuse weiß man, dass das Fehlen von GPT in Embryonen letal ist (Taylor. M. 2011). Es ist daher denkbar, dass bei den Murataexperimenten durch die Zugabe von Tunicamycin die Bildung von Chaperonen gestört wurden, die ihrerseits beim Entstehen der Tertiärstruktur des TBGs mitwirken. Dies würde bedeuten, dass die fehlende Glykosylierung nur indirekt einen Einfluss hat auf die Faltung des TBGs, aber nicht mittelbar.

Beim CBG beeinflusst die Glykosylierung ebenfalls die Bindung an den Liganden (Simard 2018). Bislang wurden beim CBG insgesamt nur wenige Mutationen beschrieben (Torpy 2012) und die Glykosylierungsstellen wurden noch nicht vergleichbar gentechnisch untersucht. Alle anderen bislang bekannten Serpine sind keine Bindungsmoleküle und daher nur schwer mit dem TBG in seiner Funktionalität vergleichbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *in vitro* veränderte und exprimierte Sequenz der potentiellen Glykosylierungsstellen keine Auswirkung auf die Produktion und Funktion des entstehenden TBGs hat, und somit wohl auch nicht auf die Faltung und die räumliche Struktur des reifen Proteins.

Die Glykosylierungen spielen aber eine sehr wichtige Rolle beim Export des Proteins ins Medium; hierfür genügt es nicht, dass ein Signalpeptid vorhanden ist. Es muss eine Glykosylierung vorhanden sein, damit der Export aus der Zelle grundsätzlich funktioniert. Interessant wäre die Frage, wie viel Glykosylierung minimal notwendig ist, damit das TBG ins Medium exportiert wird. Hierzu müssten entsprechende Mutanten konstruiert werden, die dann jeweils nur noch eine einzige der Glykosylierungsstellen in der Aminosäuresequenz

enthalten. Die Kohlenhydratreste des TBGs sind essenzielle Voraussetzung für den Export aus der Zelle in das umgebende Medium. Sie regulieren die Clearance des Moleküls im menschlichen Serum und bestimmen seine Lebensdauer im Blut, wie schon früher nachgewiesen wurde (Ain 1987). Sie haben aber offensichtlich keinen Einfluss auf die Faltung des Proteins oder auf seine Bindungsaffinität zum Liganden T_4 .

Abnormalitäten in der Menge und der Funktion des TBGs führen zwar zu Abweichungen beim Gesamt- T_4 im Serum, aber das bioaktive, freie T_4 (fT_4) ist bei diesen Personen in gleicher Menge vorhanden, daher ist es bemerkenswert, dass sich TBG als Bindungsprotein überhaupt evolviert hat und es sich im Blut vieler Säugetierarten findet. Patienten mit TBG-Mangel oder -Exzess sind klinisch unauffällig und euthyroid. Man kann davon ausgehen, dass das Vorhandensein eines so spezifischen Bindungsproteins aber irgendeinen zusätzlichen evolutionären Vorteil bieten muss, sonst hätte es sich nicht entwickelt und die beiden anderen Thyroxin-bindenden Proteine Transthyretin und Albumin würden ausreichen, um die Schilddrüsenhormone im Serum zu binden. Auch die hohe spezifische Bindung an TBG ist bemerkenswert und muss einen Selektionsvorteil bedeuten.

Bindungsproteine wie TBG oder CBG gleichen zum einen Serumschwankungen ihrer Liganden aus und verhindern durch die Bindung auch eine schnelle renale Clearance der Liganden; sie ermöglichen hohe Serumwerte an T_4 (tT_4) (Schussler 2000). Die Bindungsproteine schirmen die hydrophoben Schilddrüsenhormone vom wässrigen Milieu des Serums ab und wirken daher als Puffer für die Konzentration an freiem T_4 (fT_4), das von den Zellen aufgenommen werden kann. Allgemein gesprochen stellen die Bindungsproteine eine flexible Reserve des Körpers an Schilddrüsenhormonen dar. Bei TBG Mangel oder Exzess sind die Konzentrationen an Gesamtschilddrüsenhormon geändert, aber nicht die Konzentrationen der freien Hormone.

Bei der Beobachtung von Leistungs- und Extremsportlern fällt auf, dass die Wirkungen von T_4 bei Thyroxin-substituierten Sportlern zeitlich verzögert eintreten: Erst eine Weile nach der Einnahme ist eine körperliche Höchstleistung möglich. Beginnt das Leistungstraining sofort nach der Einnahme, so klagen diese Sportler über Taubheit in den Extremitäten, Leistungsminderungen und andere Symptome. Somit stellt das TBG möglicherweise gerade bei starken körperlichen Belastungen ein effizientes Puffersystem dar für T_4 , da es Serumschwankungen abfedert. Thyroxin-substituierte Patienten können dies nicht alleine ausgleichen. Interessant wäre die Frage, ob auch Patienten mit TBG-CD (kompletter TBG-Mangel) und TBG-Mangel in Bezug auf Extremsport diese Symptome zeigen; dies wäre ein Beleg für die Pufferung durch TBG in der Leistungssituation. Heute fällt ein TBG-Mangel kaum auf, da wir nicht mehr ständig auf der Flucht vor Säbelzähntigern sind wie noch unsere Vorfahren. Für diese bot das TBG aber sicher einen Überlebensvorteil in Extremsituationen. Es ist naheliegend, dass die geänderten TBG-Serumspiegel bei Patienten mit TBG-Mangel oder Überschuss möglicherweise von Unterschieden in der Glykosylierung herrühren; die DNA-Sequenzen der TBG-Gene dieser Personen sollten hierfür analysiert werden in Bezug auf Konsensussequenzen für Glykosylierungen.

Die Substitution von Schilddrüsenhormonen ist häufig geprägt durch eine langwierige Phase der Dosiseinstellung. Therapeutisch interessant wäre die Entwicklung eines synthetischen,

stärker glykosylierten TBGs, das zusätzlich zum Thyroxin bei Hypothyreose verabreicht werden könnte. Es hätte dann eine deutlich längere Halbwertszeit als das normale TBG und könnte Schwankungen im T₄-Spiegel im Tagesverlauf stärker abfedern, was eventuell eine bessere Einstellung der Patienten ermöglicht. Beim EPO wurde dieser Ansatz des Glycoengineerings bereits erfolgreich durchgeführt (rhEPO, rekombinantes humanes EPO) (Su D. 2010).

5 Zusammenfassung

Das Thyroxin-bindende Globulin (TBG) gehört zur Proteinsuperfamilie der Serpine (**Serine Protease Inhibitoren**). Es ist das Haupttransportprotein für T_4 im menschlichen Serum und hat eine bemerkenswert hohe Bindungsaffinität zu seinem Liganden mit einem K_a von $1,6 \times 10^{10}/M$. Es ist ein Serumprotein, das glykosyliert ist.

In dieser Arbeit wurde untersucht, in wie weit die Glykosylierung für die räumliche Struktur und die Funktion des TBGs wichtig ist. Hierfür wurden die Glykosylierungsstellen auf DNA - Ebene entfernt:

Die cDNA des menschlichen TBGs wurde in den bakteriellen pSelect-Vektor kloniert, um sie anschließend in einer gerichteten Mutagenesereaktion gezielt zu verändern. Jede der fünf potenziellen Stellen für die N-Glykosylierung des TBG-Gens wurde einzeln und gezielt aus dem Vektor entfernt. Anschließend wurden die mutierten cDNAs in vitro transkribiert in synthetische messengerRNA. Diese synthetischen RNAs wurden in Retikulozytenlysat zur Expression der mutierten Genprodukte verwendet. Ebenso wurde die RNA direkt in *Xenopus laevis* Oozyten injiziert zur Expression.

Die entstandenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE analysiert und ihre spezifische Bindungsaffinität sowohl in einem T_4 -Bindungsassay als auch in einer Scatchard-Analyse gemessen.

Die entstandenen Proteine der jeweils einzelnen Glykosylierungsmutanten zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Stärke der Expression der künstlich mutierten Proteine oder in der Bindungsaffinität, jeweils im Vergleich zum Wildtyp-TBG.

Als weiteres Ergebnis konnte festgestellt werden, dass die letzte der fünf Glykosylierungsstellen des Proteins bei Aminosäure Asn³⁹¹ offensichtlich überhaupt nicht zur Glykosylierung verwendet wird in den hier eingesetzten eukaryotischen Expressionssystemen: weder im Retikulozytenlysat noch in den *Xenopus* Oozyten bestand ein Unterschied zwischen dieser Mutante und dem Wildtyp-TBG. Eine komplett-Mutante, die überhaupt keine der Asn-X-Thr/Ser-Stellen mehr im TBG-Gen enthielt, die potenziell glykosyliert werden können, wurde im Retikulozytenlysat normal exprimiert, aber überhaupt nicht in den noch vollständigen Zellen der *Xenopus* Oozyten.

Daraus kann man wiederum schlussfolgern, dass das grundsätzliche Vorhandensein einer N-Glykosylierung essentiell ist, damit das Protein während der Reifung durch den Zellapparat des eukaryotischen Systems transportiert wird und anschließend ins Medium sezerniert wird, aber dass die N-Glykosylierung keinen Effekt auf die Faltung der räumlichen Struktur und die Funktion des TBGs hat, abgesehen von den bereits früher bekannten Auswirkungen auf die Halbwertszeit des TBGs im menschlichen Serum.

Anders formuliert ist beim TBG die Glykosylierung die Voraussetzung für die Sezernierung in das umgebende Medium und beeinflusst die Halbwertszeit im menschlichen Serum, damit auch den Serumspiegel. Die Glykosylierungsstellen an sich haben keinen Einfluss auf die Faltung des Moleküls, da der Ligand T_4 immer gebunden wird, egal, welche der fünf Glykosylierungsstellen entfernt wurde.

6 Verwendete Materialien und Methoden

6.1 Inhaltsverzeichnis der Methoden und Lösungen

(alphabetisch geordnet, zuerst Methoden, dann Lösungen, dann Sequenzen)

Annealing-Temperatur von DNA/DNA	62
Aufreinigung der DNA	62
Aufreinigung der RNA für die <i>in vitro</i> -Translation	62
Bakterienanzucht und -Lagerung	62
Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren	63
Flüssigkulturen	63
GeneClean	63
Gerichtete Mutagenese	63
Herstellung kompetenter Zellen	64
Isopropanolfällung von Nukleinsäuren	64
Herstellung einzelsträngiger Vektor-DNA	64
Linearisierung der Plasmid-DNA	65
Maxi-Präparation von Vektor-DNA	65
Mini-Präparation von Vektor-DNA	65
Phosphorylierung der synthetischen Oligonukleotide	65
T ₄ -Bindungsassay	65
Transformation kompetenter Zellen	66
Transkriptionsreaktion T7 mMessage mMachine	67
Scatchard-Analyse der Bindungsaffinität von TBG-Proben	67
Sequenzierung von DNA	67
Restriktionsenzym HindIII	69
Retikulozytenlysat	69
UV-Densitometrie zur Qualifizierung und Quantifizierung von Nukleinsäuren	70
Verwendete Bakterienstämme	70
<i>Xenopus</i> Oozyten	70
Zentrifugationsentsalzung	72
Lösungen	72
Auftragspuffer für IEF	72
	59

Acrylamidlösungen	72
PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese)	73
Ansatz für denaturierende DNA-Gele	73
Sequenzierungsgele	73
Arbeitslösung	74
Ansatz für native DNA-Gele	74
Ansatz für IEF	74
10% APS	74
ATP-Lösung	74
Antibiotika-Stocklösungen	74
10% APS	74
Barbital Buffer (BB)	74
BSA (Rinderserumalbumin)	74
Dithiothreitol	75
Elutionspuffer DNA aus PAA-Gelen	75
Ethidiumbromid	75
10 x Elektrodenpuffer für SDS-PAGE	75
Kollagenaselösung	75
LB-Medium	75
LB-Agar	75
LB-amp	75
LB-tet	76
Ligationsansatz	76
Lösung C	76
Lösung D für TBG-Untersuchungen (IEF, T4-Bindungstest, Scatchard)	76
OR- Medien	76
PBS + BSA	77
Puffer A	77
Phenollösung Phenol-TE, pH 8,0	77
Phenol-H ₂ O, pH 4,5	77
PBS -Puffer 10 x	77
PEG	77

Probenpuffer	77
T ₄ -Standard	78
T ₄ - Verdünnungen für Messungen	78
50 x TAE	79
20 x TBE	79
TYM - Medium	79
TFB 1	79
TFB 2	79
1 x TE	79
TYM	79
TB	80
Puffer A für Immunopräzipitation	80
2 x YT	80
Klonierungsvektor pSELECT-1	80
Oligonukleotide	83
TBG-Gen (synonym: SERPINA7; TBGQTL)	83
cDNA – Sequenz von TBG	85
Proteinsequenz von TBG	86

6.2 Methoden und Lösungen

Annealing-Temperatur von DNA/DNA

Zur Berechnung der maximal möglichen Anlagerungstemperatur (Annealingtemperatur) von DNA an DNA, z.B. eines Primers an seine Zielsequenz für die PCR, verwendet man folgende Faustregel:

$$T_S = 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$$

Aufreinigung der DNA

Zur Aufreinigung der DNA vor der Transkription muss absolut RNase-frei gearbeitet werden. Man fügt 100 µl Phenol-H₂O zu der linearisierten, geschnittenen DNA, vortex kurz und zentrifugiert 20 Minuten bei 14000 Upm. Der Überstand wird in neues Reaktionsgefäß gegeben und diese Reinigung 2-3 x wiederholt.

90 µl des Überstands werden in ein neues Eppendorfcup gegeben und 100 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Dann 5 Minuten bei 5000 Upm zentrifugieren und eine Ethanolfällung anschließen. In 50 µl H₂O lösen.

Die Endkonzentration sollte 0,5 µg/µl betragen.

Aufreinigung der RNA für die *in vitro*-Translation

Nach Zugabe von 30 µl H₂O und 25 ml LiCl wurde die RNA 30 Minuten bei -20 °C präzipitiert. Bei 4 °C wird für 15 Minuten bei 14000 UpM zentrifugiert.

Danach wird die RNA eines 20 µl-Ansatzes in 12 µl H₂O aufgenommen.

Zur Stabilisation wird 1µl RNasin (animal injectable grade) hinzugefügt.

Vor der Injektion in *Xenopus* Oozyten wird die Lösung 2 Minuten mit 14000 UpM abzentrifugiert, damit nicht gelöste Kristalle nicht das Aufziehen in die Glaskapillare stören; für die Verwendung im Kaninchen-Retikulozytenlysat wird sie direkt eingesetzt.

Die Länge der transkribierten RNA liegt bei ungefähr 1,3 kB. Als Kontrolle führt man eine analytische Agarosegelelektrophorese durch; hierbei trägt man den zur Transkription verwendeten Vektor mit auf.

Nach ca. 15 Minuten DNase-Verdauung ist der linearisierte Vektor im Reaktionsansatz nicht mehr nachweisbar.

Bakterienanzucht und -Lagerung

Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, Plasmide als reine DNA in 10 mM TRIS pH 8,0 oder in 1x TE Puffer zu lagern und bei Bedarf frisch zu transformieren, z.B. in *E. coli* JM109 oder DH5.

Auch Stabkulturen oder Glycerolstocks sind möglich, jedoch sind beim Einfrieren von kompetent gemachten *E. coli*s und anschließender Transformation besser reproduzierbare Koloniezahlen zu erreichen.

Alle mutierten Klone wurden als reine Plasmide in 1x TE Puffer eingefroren und bei Bedarf transformiert.

Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren

Zum Entsalzen und Ausfällen von DNA wird eine Ethanolfällung durchgeführt.

Dazu wird die Proben-DNA mit $\frac{1}{10}$ Vol. 3 M NaAc pH 7,0 und 3 Volumenanteilen Ethanol gemischt und 2 Minuten in flüssigen Stickstoff oder ü. N. bei -20 °C oder 20 Minuten bei -70 °C gefällt. Nach 20 Minuten wird bei 14000 Upm abzentrifugiert. Mit 70%-igem Ethanol wird das Pellet vorsichtig gewaschen, nochmals für 10 Minuten zentrifugiert bei 14000 Upm und trocken pipettiert. Die Probe wird 10 Minuten bei 37°C getrocknet und in einem geeigneten Volumen destilliertem Wasser oder 1 x TE oder 10 mM TRIS pH 8,0 gelöst.

Für die Fällung von RNA wird Natriumacetat mit pH 4,7 verwendet.

Alternativ kann auch eine Isopropanolfällung durchgeführt werden.

Flüssigkulturen

Bakterien in Flüssigkulturen werden immer ausgehend von einer Einzelkolonie einer frischen Platte angezüchtet.

Dazu verwendet man sterilisierte Zahnstocher, die man mit einer Kolonie beimpft und in ca. 2 ml LB-Medium, ggf. mit Antibiotikum, gibt. Diese sogenannte Minikultur lässt man bei 37 °C ü. N. schütteln. Größere Mengen an Bakterien züchtet man in Maxikulturen an, die bis zu 1 l Medium enthalten und ebenfalls ü. N. bei 37 °C geschüttelt werden.

GeneClean

Zur Aufreinigung von DNA von 500 Basen bis 16 kB werden die Fragmente aus präparativen Agarosegelen ausgeschnitten und gewogen. 3 x Volumen 6 M NaI zugeben (1 g = 1 ml) und 5 min bei 55 °C Agarose auflösen.

Glasmilch 1 min vortexen und 5 - 15 µl Glasmilch zugeben. 5 min auf Eis inkubieren, 5 Sekunden bei 14000 UpM zentrifugieren und den Überstand verwerfen.

3 x waschen mit 500 µl eiskaltem NewWash, dazu 5 Sekunden zentrifugieren, Überstand verwerfen, lösen in NewWash. In H₂O oder 10 mM Tris pH 8,0 das Pellet lösen und 3 min bei 50 °C inkubieren.

Durch eine Zentrifugation für 15-30 Sekunden wird die Glasmilch pelletiert und die DNA befindet sich im Überstand.

Gerichtete Mutagenese

Zu 2 µl der einzelsträngigen Vektor-DNA fügt man 1 µl (= 0,25 pmol) des Ampicillin-Reparaturoligonukleotides, 1,25 pmol des mutagenen Oligonukleotides und 2 µl 10x Annealingpuffer hinzu und füllt die Reaktion auf 20 µl mit Aqua dest. auf.

Die Reaktion wird auf 70 °C erhitzt und innerhalb von mind. 20 Minuten auf RT abgekühlt.

Dann vervollständigt man den zweiten Strang durch Zugabe von 1 µl T4 DNA-Polymerase, 1 µl T4 DNA-Ligase und 3 µl 10 x Synthese-Puffer in 30 µl Volumen bei 37 °C in 1 1/2 h.

Herstellung kompetenter Zellen

E. coli-Zellen gehören leider zu den Bakterienarten, die nicht von Natur aus kompetent sind, d.h. die freiwillig keine Fremd-DNA aufnehmen. Daher muss man sie nach einem ausgeklügelten Protokoll anzüchten, um Plasmid-DNA übertragen zu können:

Den gewünschten *E. coli*-Stamm auf einer LB-Platte ausstreichen und bei 37 °C ü. N. anwachsen lassen. Ausgehend von einer Einzelkolonie werden dann 20 ml TYM-Medium in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikanen angeimpft und bei 37 °C ü. N. geschüttelt. Dann werden 480 ml TYM zugegeben.

Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 erntet man die Bakterien, indem man die Kultur 15 Minuten lang bei 4 °C und 4200 Upm zentrifugiert.

Der Überstand wird abgegossen und 100 ml kaltes TFB1 dazugegeben. Dann werden die Zellen mit Hilfe einer Pipette vorsichtig vom Gefäßboden gelöst durch Auf- und Abpipettieren (nicht vortexen!).

Die Suspension wird für 8 Minuten bei 4 °C und 4200 Upm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Zu dem Pellet gibt man 20 ml TFB 2 dazu und mischt wie vorher vorsichtig.

Dann rasch je 500 µl der Suspension in sterile Eppendorfcups füllen und in flüssigem Stickstoff schockgefrieren.

Die kompetenten Zellen bei -80 °C lagern und bei Bedarf erst kurz vor Verwendung und rasch auftauen, da sonst die erzwungene Kompetenz der

Isopropanolfällung von Nukleinsäuren

Wie Ethanol-fällung, aber es wird lediglich 0,7 Vol. Isopropanol zur Probe hinzugefügt und die Probe wird nicht mehr gewaschen. Das Ausfällen erfolgt bei Raumtemperatur. Der Vorteil von Isopropanol gegenüber Ethanol liegt in der fast vollständigen Entfernung von Salzen aus der Lösung. Anschließend kann noch mit 70%-igem Ethanol nachgewaschen werden.

Herstellung einzelsträngiger Vektor-DNA

Für die Herstellung von einzelsträngiger Vektor-DNA für die Mutagenese transformiert man den zu mutierenden Vektor (hier: pSpT-38) in kompetente *E. coli* JM 109. Man nimmt eine Einzelkolonie ab und impft 2 ml TYP - Medium mit Tetrazyklin (15 µg/ml) als Übernachtskultur an. Am nächsten Tag werden 5ml TYP mit Tetrazyklin mit 100 µl der Übernachtskultur angeimpft. Nach 30 Minuten infiziert man die Kultur mit 40 µl eines Helferphagen, M13K07 oder R408, die zum Altered-sites®-System gehören.

Die Effizienz beider Phagen ist annähernd gleich. Nach ü. N.-Inkubation reinigt man die gebildete Einzelstrang-DNA auf, indem man zuerst den Phagen ausfällt durch Zugabe von 0,25 x Vol. Phagen-Präzipitationslösung in den abzentrifugierten Kulturüberstand (12000 G, 15 Minuten). Nach 30 Minuten auf Eis pelletiert man durch Zentrifugieren bei 12000 G, 15 Minuten. Das Pellet wird in 1x TE gelöst und nach Zugabe von 400 µl Chloroform :

Isoamylalkohol (24:1) eine Minute gevortext, danach zentrifugiert bei 12000g 5 Minuten.

Die obere Phase wird 2 x mit 0,4 ml Phenol-Chloroform gereinigt. Der gereinigte Überstand wird mit 200 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 1,2 ml Ethanol bei -20 °C für 30 Minuten

präzipitiert.

Nach Waschen mit 70%-igen Ethanol wird das Pellet in 20 µl H₂O gelöst und zur Kontrolle 2 µl in einem analytischen Agarosegel überprüft.

Bakterien wieder verloren geht.

Linearisierung der Plasmid-DNA

Der Vektor wird mit dem Enzym HindIII hinter dem Transkriptions-Stopp-Kodon des einklonierten Genabschnittes linearisiert.

Dazu nimmt man 50µg des Vektors, 10µl 10x Puffer für HindIII, 2µl HindIII (= 40u) und füllt auf 100µl auf mit Aqua dest. .

Der Ansatz wird bei 37 °C inkubiert, nach 3 Stunden über ein analytisches Agarosegel überprüft und gegebenenfalls noch weiter inkubiert. Ist die DNA vollständig geschnitten, wird sie aufgereinigt.

Maxi-Präparation von Vektor-DNA

Die Präparation großer Mengen Vektor-DNA aus Maxi-Kulturen erfolgt mit dem Plasmid Maxi Kit von Quiagen nach Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der Reinheit und Menge der isolierten DNA wird eine UV-densitometrische Messung sowie ein 1%iges analytisches Agarosegel durchgeführt.

Mini-Präparation von Vektor-DNA

Zur Minipräparation von Vektor-DNA aus 5ml *E. coli*-Kultur wurde das QuiaPrepSpin PlasmidPrep-Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die so erhaltene DNA kann in beiden Sequenzverfahren direkt nach Kontrolle über ein analytisches Agarosegel verwendet werden; zur automatischen Sequenzierung sollte allerdings in 10mM TRIS pH8,0 oder H₂O dest. eluiert werden (kein EDTA).

Phosphorylierung der synthetischen Oligonukleotide

Da die Oligonukleotide synthesebedingt am 5'-Ende keinen Phosphatrest tragen, wurden sie zuerst phosphoryliert.

Hierfür inkubiert man 2,5 µl 10 mM ATP, 100 pmol des Mutageneseoligonukleotides, 2,5 µl 10 x Kinase Puffer und 5 u T₄ Polynukleotid-Kinase in einem 25 µl - Ansatz 30 Minuten bei 37 °C. Dann wird die Kinase 10 Minuten lang bei 70 °C inaktiviert.

T₄-Bindungsassay

Zur raschen Quantifizierung der aus *Xenopus* gewonnenen Proteinmenge eignet sich am besten ein T₄-Bindungsassay. Mit diesem Test bestimmt man die Bindungskapazität der TBG-Proben für T₄, rückgerechnet also die Menge an vorhandenem, Thyroxin-bindenden TBG. Man sättigt zunächst das TBG der zu untersuchenden Probe aus *Xenopus*-Oozyten mit radioaktivem, ¹²⁵J-markiertem T₄. Nach Inkubation wird das überschüssige, freie T₄ an ein Anionenaustauscherharz gebunden (Resin), der sich am Boden absetzt und somit wird das

nicht gebundene T₄ wieder entfernt.

Im Überstand des Probenröhrchens befindet sich dann nur noch gebundenes, markiertes T₄, welches an das TBG gebunden ist und das sich im γ -Zähler quantifizieren lässt.

Durch Zusatz von Barbitalpuffer wird bei Serumproben eine Verdrängung von T₄ erreicht, das an Transthyretin und/oder Albumin gebunden ist; dies beeinflusst die Bindung an TBG nicht.

Als Standard dienen drei Verdünnungen eines Kontrollserums, das zuvor im Routinelabor bestimmt worden war.

Die Lösung D muss immer frisch angesetzt werden, da sich das T₄ zersetzt. Als Standard dient das Kontrollserum eines Mitarbeiters, das zuvor im Routinelabor bestimmt wurde.

Die Verdünnungsreihe der Kontrolle:

Konz. 1 μ l:	2 μ l Serum + 18 μ l TB
Konz. 0,3 μ l:	6 μ l (Konz. 1 μ l) + 14 μ l TB
Konz. 0,1 μ l:	6 μ l (Konz. 0,3 μ l) + 12 μ l TB

Es werden je 10 μ l von diesen Verdünnungen eingesetzt in die Röhrchen 1 bis 3.

Zur Bestimmung der Proben setzt man 50 μ l oder 100 μ l Oozytenmedium ein.

Zwei Röhrchen bleiben Protein-frei zur Bestimmung der Gesamtrate an Zerfällen und des Leerwertes. Zu jedem Röhrchen gibt man 2 ml Lösung C und vortext.

Dann wird der Inhalt zu je 950 μ l in zwei neue Reihen von Röhrchen verteilt, von denen eine je 50 μ l Lösung D und die andere 50 μ l TB enthält (Verdrängungsreihe und Leerwert). Nach dem Vortexen inkubiert man 30 Minuten bei Raumtemperatur, dann 30 Minuten auf Eis. Man fügt je 1 Portion Resin hinzu, jedoch nicht in das Röhrchen total (T) und schüttelt es zwei Minuten. Wichtig ist hierbei, darauf zu achten, dass immer die gleiche Menge an Resin zugegeben wird.

Man gibt je 2 ml eiskaltes H₂O in jedes Röhrchen und schüttelt kurz auf.

Man überführt von jeder Probe 1 ml in ein neues Counterröhrchen, jedoch ohne Resin mitzunehmen.

Die Messung erfolgt in einem für ¹²⁵I-Zerfälle eingestellten Gamma-Counter, und zwar immer: (Probe + TB)-(Probe + Lösung D).

Verwertbare Expressionsversuche in *Xenopus* Oozyten ergeben Counterwerte im Bereich ab 10000 Zerfälle pro 100 μ l eingesetzter Probe, der Leerwert sollte 2000 nicht übersteigen, die Gesamtzerfälle liegen bei frischer Radioaktivität über 90000.

Das Serum ergibt in der Verdünnung Konz. 1 μ l mindestens 20000 Zerfälle. Alle in einer Scatchard-Analyse zu bestimmenden Proben müssen im gleichen Messbereich des Bindungstests liegen, um die Ergebnisse korrelieren zu können.

Transformation kompetenter Zellen

Je 10 μ l der zu transformierenden DNA in gekühlte Reaktionsgefäße vorlegen. Dann nimmt man die kompetenten Zellen aus dem -70 °C Tiefkühlschrank, taut sie rasch mit den Händen auf und gibt je 100 μ l davon in die gekühlten Röhrchen.

Danach 30 Minuten auf Eis stehen lassen und währenddessen etwas LB-Medium auf 37 °C

vorwärmen.

Als Hitzeschock den Transformationsansatz für zwei Minuten auf 42 °C erhitzten, auf Eis abkühlen lassen und je 500 µl vorgewärmtes LB-Medium zugeben.

Für eine Stunde bei 37 °C schütteln.

Danach 50 µl bis 200 µl der Transformation ausplattieren auf LB-Agar (ev. mit Antibiotikum).

Über Nacht bei 37 °C inkubieren.

Transkriptionsreaktion T7 mMessage mMachine

Die Transkription wird mit dem „T7 mMessage mMachine“-Kit exakt durchgeführt nach Angaben des Herstellers.

Dazu gibt man zu 10 µl Puffer pro Ansatz jeweils 5 µl DTT, 2,5 µl BSA, 10 µl rNTPs, 2,5 µl cap, 1 µl RNasin, 1 µl T7 Polymerase und 16 µl H₂O. Zur präziseren Pipettierung setzt man den Ansatz im 10x Volumen an, mischt alles gut und nimmt dann je 1/10 Volumen pro Reaktion.

Dann gibt man 2 µl der DNA hinzu und lässt die Reaktion 1h bei 37°C reagieren.

Anschließend wird 1 µl des Transkriptionsansatzes zur Kontrolle durch eine Gelelektrophorese über ein 0,8%-iges RNA-Agarosegel analysiert.

Scatchard-Analyse der Bindungsaffinität von TBG-Proben

Die Scatchard-Analyse ist eine mathematische Methode zur Analyse von biochemischen Bindungsverhältnissen unter Gleichgewichtsbedingungen, mittels derer man Aussagen treffen kann sowohl über die Valenz wie auch über die Affinität einer Bindung zwischen Rezeptor und Ligand (Scatchard 1949).

Man bestimmt experimentell die spezifische Bindung des Liganden T₄ an TBG bei unterschiedlichen Konzentrationen und stellt dies graphisch als Diagramm („Scatchard Plot“) dar.

Proben von TBG-haltigem Medium aus Serum oder Oozyten-Medium werden mit 125-I- T₄ inkubiert und danach mit wachsenden Mengen nicht-radioaktivem T₄ versetzt. Dies verdrängt dann das radioaktiv markierte T₄ aus seiner Bindung vom TBG in Abhängigkeit von der Bindungsaffinität der untersuchten Moleküle. Nach der Inkubation wird das nicht gebundene T₄ abgetrennt durch Zugabe von Anionenaustauscherharz (Resin). Das an TBG gebundene, radioaktiv markierte T₄ kann dann im γ-Zähler bestimmt werden. Die Konzentration an TBG in den verschiedenen Proben und ihre jeweilige Affinitätskonstante wird dann nach Scatchard berechnet (Scatchard-Plot).

Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung nach Sanger beruht auf dem Kettenabbruchverfahren. Dabei wird zunächst einzelsträngige Template-DNA hergestellt, entweder durch alkalische Denaturierung oder wie hier durch Zugabe von Glycerol und Erhitzen. Der Reaktionsprimer lagert sich an die Template-DNA an der komplementären Stelle an. Durch Zugabe von Desoxynukleotiden und einer DNA-Polymerase beginnt die Verlängerung des zweiten Stranges, ausgehend vom Primer.

Man setzt parallel vier Reaktionsansätze an, die sich durch die Zugabe von verschiedenen Didesoxynukleotiden unterscheiden, die zu Kettenabbrüchen während der Reaktion führen sollen. Im ersten Ansatz wird also ddATP zugesetzt, im zweiten ddGTP usw. . Dadurch entstehen im ersten Ansatz nur synthetische DNA-Moleküle, die alle an einem „A“ enden, im zweiten an einem G usw. Trennt man die vier Ansätze parallel nebeneinander durch eine hochauflösende denaturierende PAGE auf, so lassen sich die nur minimal unterschiedlich großen Produkte differenzieren und man kann die entstehende Sequenz-„Leiter“ sehr gut lesen. Die Markierung der entstandenen Moleküle erfolgt entweder wie in unserem Fall durch Zugabe von radioaktiv markiertem, ^{35}S -dATP zu den nicht-radioaktiven Nukleotiden und Exponieren der getrockneten Gele auf BioMax-Filme oder seit neuerem durch Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen (s.a. automatische Sequenzierung).

^{35}S -Sequenzierung von DNA mit Sequenase®

Zur Denaturierung der DNA gibt man 5µl Plasmid Denaturing Reagent und 1µl des Primers (20ng/µl) zu 7 µl DNA, erhitzt für 5 Minuten auf 95°C und kühlt die Reaktion auf Eis ab. Nach Zugabe von 2 µl Plasmid Reaction Buffer inkubiert man die Reaktion 10 Minuten bei 37°C.

Für 6 Proben stellt man ein Reaktionsgemisch wie folgt her: 6,0 µl DTT, 3,0 µl ^{35}S -ATP und 12 µl 1:5 verdünnter Lab-Mix werden mit 6,0 µl Sequenase gemischt. Davon werden 4,5µl zu jeder der Proben pipettiert und 10 Minuten bei RT inkubiert. Jeweils 2,5 µl Terminationsmix werden in eine Mikrotiterplatte vorgelegt (G/A/T/C) und je 4,5µl des Probengemisches dazu pipettiert.

Für 5 Minuten bei 37°C stehen lassen, dann je 4µl Stopplösung zugeben. An dieser Stelle kann man die Sequenzreaktion unterbrechen, indem man die Proben bei -20°C einfriert. Vor jedem Sequenzgel müssen die Proben zur vollständigen Denaturierung für 2 Minuten auf 75°C erhitzt werden.

Die Elektrophorese erfolgt bei 100W und 700 bis 2000V, die Dauer hängt vom Bereich der Sequenzreaktion ab, die identifiziert werden soll.

Das Gel wird bei 70°C getrocknet und für 1 Tag exponiert auf BioMax-Film.

Automatische Sequenzierung von DNA mit dem Abi Prism®

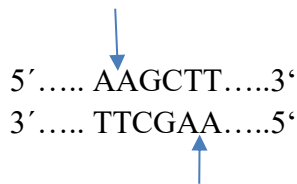
Zur automatischen Sequenzierung wird die Proben-DNA mittels Cycle-Sequencing vervielfältigt und wie folgt angesetzt:

0,5µg doppelsträngige DNA wird mit 5pmol des entsprechenden Sequenzierprimers und 4,5µl Reaktionsgemisch versetzt und das Volumen auf 10µl mit H₂O dest. aufgefüllt. Die PCR-Reaktion besteht aus 25 Zyklen: 98°C 1 Sek., 55°C 15 Sek., 60°C 4 Minuten. Danach erfolgt eine Ethanol-fällung mit anschließendem Waschen mit 70%igem Ethanol.

Die weitere Behandlung erfolgt nach Angaben des Herstellers.

Restriktionsenzym HindIII

Das Enzym schneidet DNA wie folgt:



Retikulozytenlysat

Das kommerziell erhältliche Retikulozytenlysat von Kaninchen wird mit ^{35}S -Methionin versetzt, um radioaktiv markierte Proteine aus der gewünschten RNA zu synthetisieren.

Dazu nimmt man pro 25 μl -Ansatz:

17,5 μl Retikulozytenlysat

0,5 μl Aminosäuremix ohne Methionin

2 μl ^{35}S -Methionin

1 μl RNasin (rekombinant, Endotoxin-aufgereinigt)

1 μl der *in vitro* synthetisierten RNA.

Soll das zu synthetisierende Protein ohne Signalpeptid und glykosyliert sein, so werden je 2 μl Canine Microsomal Membranes vom Hundepankreas hinzugefügt.

Die gesamte Reaktion dauert 1 h bei 30 °C. Die Proben können dann eingefroren oder sofort weiterverarbeitet werden.

Die Analyse erfolgt anschließend über ein 10%-iges SDS-PAGE. Von einem Reaktionsansatz werden 12,5 μl zu 12,5 μl SDS-Probenpuffer gegeben und zur vollständigen Denaturierung für 2 Minuten auf 95 °C erhitzt. Der ganze Ansatz wird auftragen; als Größenmarker dienen 10 μl ^{14}C -Rainbow-Marker, die ebenfalls mit Probenpuffer versetzt und denaturiert werden.

Die Elektrophorese läuft für ca. 1 h bei 10 mA im Sammelgel, danach mit 30 mA und konstant 100 W. TBG sollte mindestens 180 Vh lang aufgetrennt werden.

Das fertige SDS-Gel wird auf Whatmanpapier aufgezogen und mit Klarsichtfolie abgedeckt. Danach wird es ca. 1 1/2 h lang bei 70 °C getrocknet und für mindestens 8 h oder ü. N. auf BioMax-Film exponiert.

Im SDS-PAGE eines Retikulozytenlysat sieht man daher beim normalen TBG sechs Banden, mit und ohne Signalpeptid sowie nicht glykosyliertes und ein- bis vierfach glykosyliertes. Den Unterschied zwischen TBG mit und ohne Signalpeptid sieht man beim TBG hier kaum im Gegensatz z.B. zum CBG.

Der Vorteil des Lysates ist die schnelle und einfache Herstellung kleiner Mengen des gewünschten Proteins; nachteilig ist vor allem die geringe Menge gewonnener Peptide, die für weitere Untersuchungen nicht ausreicht, die Verunreinigung mit den Proteinen der Retikulozyten sowie der relativ hohe Preis der Reagenzien. Die Proteine können durch Zugabe von ^{35}S -Methionin markiert und im SDS-PAGE autoradiographisch nachgewiesen werden.

UV-Densitometrie zur Qualifizierung und Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur photometrischen Bestimmung der Konzentration von gelösten Nukleinsäuren wird in Quarzküvetten bei 260 nm die optische Dichte aus einer Verdünnung von 1:200 bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht ca. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder 30 µg/ml RNA. Zur Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäure misst man die OD₂₈₀. Liegt das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ über 1,8, so ist die Nukleinsäureprobe sehr sauber. Durch diese Bestimmung können aber nur Verunreinigungen durch Proteine und hier auch nur durch die aromatischen Aminosäuren erfasst werden, aber z.B. keine Salze, die weitere Reaktionen wie Ligationen durchaus behindern können.

Verwendete Bakterienstämme

E. coli JM 109:

endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), relA1, supE44, λ⁻, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI^qΔM15]

E. coli BMH71-18 mut S:

thi, supE, Δ(lac-proAB), [mutS::Tn10] [F', proA⁺B⁺, lacI^qΔM15]

Xenopus Oozyten

Der südamerikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* lebt rein aquatisch bei 18 bis 20°C und ist an sich unkompliziert in der Haltung. Probleme treten nur durch wechselnde Wasserqualitäten auf z.B. durch Chlorierung, die aber durch Zugabe von Wasseraufbereiter zum Frischwasser vermieden werden können, oder durch Einschleppen von Infektionen durch Neuankömmlinge, die deshalb immer zunächst zwei Wochen in Quarantäne gehalten wurden. Gefüttert wird mit Protein-reichem Trockenfutter, roher Leber oder tiefgekühlten Rote Mückenlarven, die von den Tieren gerne angenommen werden.

in System zur Expression von eukaryotischen Proteinen ist die Synthese mittels injizierter RNA in reife Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Die darin produzierten Proteine werden vollständig glykosyliert, prozessiert und ins Medium sezerniert, soweit die entsprechenden Strukturen in der RNA vorhanden sind. Für die *in vitro*-Expression von TBG hat das *Xenopus*-System außerdem den Vorteil, dass die Eier in einer schwach salzigen Lösung mit ein wenig HEPES-Puffer gehalten werden können, ohne jede Zugabe von Serum oder anderen komplexen Medien, wie sie in der Zellkultur verwendet werden müssen. Da es sich beim TBG um ein Serumprotein handelt, dessen Ligand T₄ auch an andere Serumproteine bindet, ist das aus *Xenopus* gewonnene Protein aufgrund seiner Reinheit ideal für Bindungsassays und Scatchardanalysen, bei denen Serumzusätze erheblich stören würden.

Die Eier werden in Narkose nach einem Bauchschnitt entnommen. Dazu betäubt man das Tier. Dann wird ein etwa 1 cm großer Schnitt mit einem Skalpell durch das Integument geführt, ein zweiter durchtrennt die Bauchdecke. Darunter sind dann bei einem fruchtbaren Tier bereits die Eier sichtbar, die mit einer Pinzette vorsichtig herausgezogen werden können, da alle im Eisack zusammenhängen. Das Ovar wird mit einem chirurgischen Faden

abgebunden und der Faden verknotet. Dann schneidet man den Eiersack hinter der Naht ab und überführt die Oozyten in eine lichtgeschützte Petrischale mit OR-I. Peritoneum und Integument werden je nach Größe des Schnittes einzeln mit zwei bis drei Stichen genäht. Das Tier wird in ein kleines Frischwasserbecken gesetzt, wobei darauf zu achten ist, dass die Atemöffnungen über Wasser bleiben, da das noch betäubte Tier sonst ersticken kann. Nach dem Aufwachen wird es unter Beobachtung zu den Anderen gesetzt.

Das Ovar bleibt dabei erhalten und die Eier wachsen innerhalb von 4-6 Wochen nach. Einem erwachsenen Tier können so mehrmals Eier entnommen werden, die durch die ersten Operation quasi "geprint" werden und sich danach alle ungefähr im gleichen Reifestadium befinden, was das Sortieren und die Injektion erheblich erleichtert. Ein *Xenopus*-Weibchen enthält bis zu 30000 Oozyten, von denen ca. ein- bis dreitausend ausgereift sind. Diese sind über einen Millimeter groß und daher unter dem Mikroskop leicht zu handhaben. Sie besitzen einen hellen (vegetativen) Pol und einen dunklen (animalischen) Pol, unter dem der Zellkern liegt.

Nach der Eientnahme werden die Oozyten bei 19 °C dunkel in OR-I-Medium aufbewahrt. Das aus der Narkose erwachte Tier kann sofort wieder ins Aquarium zurückgesetzt werden.

Eine Behandlung mit Kollagenaselösung entfernt die Eihüllen. Danach wird das Medium gegen OR-II gewechselt und die Oozyten werden unter einem Mikroskop sortiert.

Eine frisch gezogene Kapillare wird im Binokular mit einer Feinpinzette so gebrochen, dass eine abgeschrägte Spitze mit einem Durchmesser von ca. 20 µm entsteht. Dann wird RNase-freies Mineralöl mit einer Kanüle in die Glaskapillare luftblasenfrei eingefüllt und die Kapillare auf den Stempel des Microdispensers aufgesteckt. Die zuvor synthetisierte und aufgereinigte RNA wird in die Glaskapillare aufgezogen und äquatorial in Richtung des Zellkerns injiziert. Dabei erhält jedes Ei 0,1µl RNA-Lösung mit einer Konzentration von ca. 0,5 ug/µl. Man injiziert idealerweise immer 15 bis 20 Eier und sortiert dann diese um in eine frische Schale mit neuem OR-II, die auf Eis stehen bleibt. Dadurch schließen sich die Injektionswunden wesentlich besser,

Die Eier werden drei Stunden lang auf Eis im Dunklen kühl gestellt, um ein besseres Verschließen der Injektionswunde zu erreichen; so dass mehr Eier das Prozedere überleben. Danach werden die nachsortierten, noch intakten Eier in Kulturschalen mit 5µl OR-III je Oozyt überführt und bei 19°C im Dunklen inkubiert. OR-III enthält zusätzlich zu OR-II Natriumpyruvat, das den Eiern als Energiequelle dient.

Die Oozyten produzieren ca. 6 Stunden nach der Injektion des gewünschten Proteins; das Maximum wird 48 bis 72 h später erreicht.

Je nach Art des exprimierten Proteins ergibt sich das weitere Vorgehen: intrazelluläre Proteine können durch Aufschluss der Eier und Zentrifugation aus dem klaren Überstand gewonnen werden; sezernierte Proteine werden in das Medium abgegeben und können durch täglichen Medienwechsel geerntet werden, zum Teil über mehr als eine Woche hinweg.

Eine radioaktive Markierung der synthetisierten Proteine erreicht man durch die Zugabe von ³⁵S - Methionin ins Medium (je ca. 125µCi), die man idealerweise ab ca. 24 h nach der

Injektion beginnt. Bei jedem Mediumwechsel, der normalerweise im 24 h - Rhythmus durchgeführt wird, kann man neues ^{35}S - Methionin zusetzen. Zur Untersuchung der Proteine führt man einen T_4 - Bindungstest zur schnellen Quantifizierung durch, eine Scatchard-Analyse zur exakten Bestimmung der Bindungsaffinität und ein SDS-PAGE zum quantitativen und qualitativen Nachweis der Synthese.

Zentrifugationsentsalzung

Zum Aufreinigen und Umpuffern von DNA, z.B. nach einer PCR und bei Restriktionsverdau mit mehreren Enzymen mit unterschiedlichen Puffern eignet sich eine einfache Zentrifugationsentsalzung. Der Vorteil gegenüber einer Ethanolfällung ist die vollständige Entfernung von Salzen, insb. Na^+ und K^+ , die sonst nachfolgende Reaktionen stören können. Eine Fertigsäule Sephacryl S-300 HR für DNA von ca. 0,4 bis 2,5 kB verwenden. Dazu Säule kurz vortexen, unten abbrechen, auf ein Eppendorfcup ohne Deckel stecken und 1 - 2 Minuten 5000 UpM zentrifugieren. 200 μl H_2O zugeben; wenn das Eluat in Wasser statt TE gelöst sein soll und 1 - 2 Minuten bei 5000 UpM zentrifugieren.

Dann ein neues Eppendorfcup verwenden und die Probe auftragen, ev. unter Zugabe von 5 μl GEB oder GLB, und anschließend 1-2 Minuten bei 5000 UpM eluieren.

Durch den Zusatz von farbigem Probenpuffer kann man besser erkennen, ob die Säule ausreichend war für die verwendete Probe oder ob die Bindungskapazität für die aufgetragene Probe zu knapp bemessen war.

Lösungen

Auftragspuffer für IEF

Auftragspuffer: 9 μl Barbitol Buffer und 1 μl ^{125}I - T_4 .

4 μl Probe und 1 μl Auftragspuffer mischen, davon 1-2 μl auftragen.

Acrylamidlösungen

für Proteingele

2,7% C, 30% T - Acrylamid-Lösung:

Acrylamid (40%) 29,2% 365 ml

Bisacrylamid 0,8% 4g

Ad 500 ml mit Aqua dest.

Acrylamidlösungen werden bei 4°C im Dunklen gelagert unter Zugabe von Ionenaustauscher (BioRad, AG 501-x8 CD) zur Stabilisierung der Lösung.

für DNA-Gele

4% C, 40% T Acrylamid-Lösung

Acrylamid 40% 38,4% 192 g/500 ml

Bisacrylamid 1,6% 8 g/500 ml

Gel in %	3,5	5,0	8,0	12,0	15,0	20,0
----------	-----	-----	-----	------	------	------

Trennbereich (Basen)	1-2k	80-500	60-400	40-200	25-150	6-100
----------------------	------	--------	--------	--------	--------	-------

für IEF/Phast-System

3% C, 30% T Acrylamid-Lösung

Acrylamid 40% (IEF-Grade)	29,1%	72,25 ml
Bisacrylamid	0,9%	0,9 g
ad 100 ml mit Aqua dest.		

PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Ansatz für 10%ige denaturierende, diskontinuierliche Protein-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngel

30% Acrylamid/Bis	13,3 ml	10 ml
1 M Tris HCl pH 8,8	15 ml	11,25 ml
SDS 10%	0,4 ml	0,3 ml
H ₂ O	11,1 ml	8,3 ml
TEMED	66 µl	50 µl
APS 10%	133 µl	100 µl
Gesamtvolumen	40 ml	30 ml

Sammelgel

30% Acrylamid/Bis	2,5 ml	1,9 ml
1M Tris HCl pH 6,8	2,5 ml	1,9 ml
SDS 10%	200 µl	150 µl
H ₂ O	14,75 ml	11,1 ml
TEMED	10 µl	7,5 µl
APS 10%	200 µl	150 µl
Gesamtvolumen	20 ml	15 ml

Ansatz für denaturierende DNA-Gele

	5%	8%	12%
Harnstoff (8M)	14,56 g	15,56 g	14,56 g
40% Acrylamid/Bis	5 ml	8 ml	12 ml
10x TBE	3 ml	3 ml	3 ml
TEMED	50 µl	50 µl	50 µl
APS 10%	<u>100 µl</u>	<u>100 µl</u>	<u>100 µl</u>
H ₂ O	ad 30 ml	ad 30 ml	ad 30 ml

Sequenzierungsgele

Stocklösung (5%)

40% Acrylamid/Bis	62,5 ml
10 x TBE	50 ml
Harnstoff	240,2 g (8 M)

ad 500 ml mit Aqua dest.	
--------------------------	--

Arbeitslösung

Stocklösung	70 ml
10% APS	700 µl
Temed	65 µl

Ansatz für native DNA-Gele

30% Acrylamid/Bis	13,3 ml	10 ml
10 x TBE	4 ml	3 ml
H ₂ O	21,9 ml	16,85 ml
TEMED	66 µl	50 µl
APS 10%	133 µl	100 µl
	40 ml	30 ml

Ansatz für IEF

30% Acrylamid/Bis	3,5 ml
Glycerol	2 ml
Ampholine pH 4-6,5	1,5 ml
Aqua dest.	13 ml

10% APS

0,1 g Ammoniumpersulfat in 1 ml H₂O dest. lösen

ATP-Lösung

60 mg ATP in 0,8 ml H₂O pH 7,0 (mit NaOH); Volumen auf 1 ml mit H₂O dest. einstellen

Antibiotika-Stocklösungen

Ampicillin	5 mg/ml in H ₂ O, bei + 4 °C lagern
Ampicillin, Na-Salz	50 mg/ml in H ₂ O, bei -20 °C lagern
Tetrazyklin	5 mg/ml, max. 12,5 mg/ml, gelöst in 50%
Ethanol; bei -20 °C lagern	

10% APS

0,1 g Ammoniumpersulfat in 1 ml H₂O lösen

Barbital Buffer (BB)

5 Flaschen Puffer + 1L H₂O, bei 60°C lösen. Endkonzentration: 300 mM

BSA (Rinderserumalbumin)

100 mg BSA, Fraktion V

5 ml H₂O

Konzentration: 20 mg/ml

Dithiothreitol

2,25 M in 40 mM KAc pH 6.0, sterilfiltrieren und bei -20 °C lagern.

Elutionspuffer DNA aus PAA-Gelen

0,5 M	NH ₄ Ac	1,927g
10 mM	MgAc	0,11g
ad 50 ml mit aqua dest.		

Ethidiumbromid

Stocklösung 10 mg/ml

10 x Elektrodenspuffer für SDS-PAGE

30,25 g Tris Base

144 g Glycin

100 ml 10% SDS

ad 1 l mit H₂O dest.

Kollagenaselösung

2 mg/ml Kollagenase in 50 ml OR-I ansetzen und mit einem 0,45 µm Sterilfilter filtrieren. Je 2 x 25 ml unter Beobachtung ca. 1 h einwirken lassen, bis die Eier vereinzelt sind. Danach in OR-II mehrmals waschen!

LB-Medium

10 g Bacto-Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

ad 1000 ml mit aqua dest. pH 7,5 einstellen (oder 800 µl 5M NaOH zugeben), autoklavieren

LB-Agar

15 g Agar

10 g Bacto-Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

ad 1000 ml mit aqua dest. pH 7,5 einstellen (oder 800 µl 5M NaOH zugeben), autoklavieren

LB-amp

Zu LB-Medium oder Agar nach dem Autoklavieren bei 55° C Ampicillin zugeben,

Endkonzentration: 100 mg/ml.

LB-tet

Zu LB-Medium oder Agar nach dem Autoklavieren bei 55 °C Tetracyclin zugeben,
Endkonzentration: 15 µg/ml.

Ligationsansatz

DNA1 (Vektor)	1µl
DNA2 (Insert)	1µl
H ₂ O	14µl
10X Ligase buffer	2µl
10mM ATP	<u>1µl</u>
	19µl

5 Minuten auf 65 °C erhitzen, dann 10 Minuten bei RT inkubieren. Das Reaktionsgemisch für 10 Minuten auf Eis stellen und danach unter Zugabe von 1 µl T4-DNA Ligase bei 14 °C über Nacht reagieren lassen.

Lösung C

Barbital Buffer	100 ml
BSA (20mg/ml)	100 µl
¹²⁵ J-T ₄ (NEX111H/DuPont)	60 µl

Lösung D für TBG-Untersuchungen (IEF, T4-Bindungstest, Scatchard)

Barbital Buffer	2 ml
T ₄ -Standard (in Ethanol gelöst)	80 µl

OR- Medien

OR-I:

Substanz	Endkonz.	Stock	auf 1 l	auf 2 l	auf 3 l
HEPES	5 mM	-	1,192 g	2,383 g	3,575 g
NaCl	82,5 mM	5 M	16,5 ml	33 ml	49,5 ml
KCl	2,5 mM	1 M	2,5 ml	5 ml	7,5 ml
MgCl ₂	1 mM	1 M	1 ml	2 ml	3 ml
Na ₂ HPO ₄	1 mM	500 mM	2 ml	4 ml	6 ml

OR-II

Substanz	Endkonz.	Stock	auf 1 l	auf 2 l	auf 3 l
CaCl ₂	1 mM	1 M	1 ml	2 ml	3 ml
Gentamycin	100 mg/l	50 g/l	2 ml	4 ml	6 ml

OR-III

100mM Na-Pyruvat, 100µl/10ml verwenden

PBS + BSA

50 ml PBS (pH 8.0)

+50 ml BSA (20mg/ml)

bei -20°C lagern

Puffer A

für IEF

0,5M EDTA pH8,0

4ml

NaPO₄

0,141g

NaCl

0,087g

ad 100ml mit H₂O dest.

Phenollösung Phenol-TE, pH 8,0

1 kg Phenol auf 65 °C erwärmen, 1000 ml 1 M TRIS HCl pH 8,0 und 1 g Hydroxychinon (0,1%) zugeben. Ü. N. bei RT rühren lassen. Den Überstand verwerfen. Mit 500 ml 1 x TE pH 8,0 mischen und Überstand verwerfen; dies wiederholen, bis der pH-Wert im Überstand 8,0 erreicht hat.

Phenol-H₂O, pH 4,5

Wie Phenol-TE, aber mit RNase-freiem Wasser und ohne Hydroxychinon herstellen. Der pH-Wert muss nicht extra eingestellt werden, da der pH-Wert von Phenol zum Arbeiten mit RNA ohnehin im Sauern liegen sollte.

PBS -Puffer 10 x

80 g NaCl

2 g KCl

14,4 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O

2,4 g KH₂PO₄

in 800 ml Milligen-H₂O, pH auf 7,2 einstellen

ad 1 l

PEG

25% PEG /2,5 M NaCl

Ansatz:

PEG

25g

NaCl

14,61g

in 100ml H₂O

Probenpuffer

GLB

20x TBE

6 ml

Ficoll 400	1,5g
Bromphenolblau	20 µl
Xylencyanol 10%	20 µl
H ₂ O ad	10 ml

GEBS

20% Glycerin	46,5ml
0,5% Sarcosyl	10ml
50mM EDTA pH8,0	20ml
0,05% Bromphenolblau	50µl
Xylencyanol 10%	50 µl

Mit H₂O dest. ad 100 ml.

Zum Abstoppen enzymatischer Reaktionen $\frac{1}{8}$ Volumen verwenden.

Probenpuffer für SDS-PAGE

625 µl 1 M TrisHCl pH 6,8

1 ml 10% SDS

1 ml Glycerol

20 µl Bromphenolblau-Lösung

ad 10 ml, + 2% β-Mercaptoethanol.

Proben vor dem Auftragen 2 Minuten lang bei 95 °C im Probenpuffer denaturieren.

T₄-Standard

2 mg/ml T₄ in Ethanol

T₄ - Verdünnungen für Messungen

1) 110 µl T ₄ – Standard +9,9 ml TB	= 2500 fmol
2) 4 ml aus 1) + 4 ml TB	= 1250 fmol
3) 4 ml aus 2) + 4 ml TB	= 625 fmol
4) 4ml aus 3) + 4 ml TB	= 313 fmol
5) 4ml aus 4) + 4 ml TB	= 156 fmol
6) 4ml aus 5) + 4 ml TB	= 78 fmol
7) 4ml aus 6) + 4 ml TB	= 39 fmol

Aus dieser Verdünnungsreihe wurden je 50 µl eingesetzt in den Röhrchen 1 bis 7. Röhrchen 8 enthielt nur 50 µl von Lösung D; Röhrchen 9 enthielt 50 µl TB (Nullwert), Röhrchen 10 enthielt 50 µl TB, aber ohne Zugabe von Ionenaustauscherharz (Totalwert an Zerfällen). Als Standard diente eine Verdünnung eines Normalserums aus menschlichem Blut.

In allen Röhrchen wurde 1 ml der jeweiligen Probe zugegeben und wie beim T₄-Bindungstest durchgeführt und gemessen (Y. S. Murata 1985).

50 x TAE

242 g Tris-Base

57,1 ml Essigsäure abs.

100 ml 0,5 M EDTA pH 8

ad 1000 ml mit H₂O dest.

20 x TBE

Tris base 108 g

Borsäure 55 g

0,5M EDTA (pH8,0) 40 ml

auf 500 ml mit H₂O dest. auffüllen

TYM - Medium

Bacto-Trypton 20g

Hefe-Extrakt 5g

NaCl 2,9g

1 M MgSO₄ 10ml

ad 1l mit H₂O dest.

TFB 1

2 M KAc 7,5ml

1M MnCl₂ 25ml

KCl 3,73g

1M CaCl₂ 5ml

ad 500ml mit H₂O, steril filtrieren

TFB 2

1M Na-MOPS, pH 7,0 5 ml

1M KCl 5 ml

1M CaCl₂ 37,5 ml

Glycerol 75,0ml

H₂O ad 500ml, steril filtrieren

1 x TE

Endkonzentration	Ansatz	Stammlösung
10 mM Tris pH 8,0	50 ml	2 M TRIS pH 8,0
1 mM EDTA	20 ml	0,5 M EDTA pH 8,0
H ₂ O dest. ad 1 l		

TYM

20g

Bacto-Trypton

5g	Hefeextrakt
2,9g	NaCl
10ml 1M MgSO ₄ = 2,46g	
ad H ₂ O to 1l	

TB

10 mM TrisHCl pH 8,8	50ml
0,01% BSA	50µl

Puffer A für Immunopräzipitation

Endkonzentration	Stammlösung	Ansatz
10 mM TrisHCl pH 8,3	1M	1ml
150 mM NaCl	3M	5ml
1 mM EDTA	0,5M	200µl
0,5% Na-Deoxycholsäure		500mg
1% Triton X-100		1g
0,1% SDS	10%	1ml
0,1% L-Methionin		100mg
		ad 100ml, pH 8,3 (!)

2 x YT

Bacto-Trypton	16g
Hefeextrakt	10g
NaCl	<u>5g</u>

in 1000ml H₂O lösen, autoklavieren

6.3 Gen- und Proteinsequenzen

Klonierungsvektor pSELECT-1

GenBank: X65334.5, LOCUS CVPSELECT; 5675 bp DNA, linear, SYN 15-OCT-1992, VERSION X65334.5

Basen von... bis	Inhalt
ab 1	T7 transcription initiation site
5....61	multiple cloning sites
69	SP6 transcription initiation site
70..86	SP6 promoter
94..323	lac operon sequence
104..120	pUC /M13 reverse primer binding site
106..108	lacZ start codon
128..144	lac operator
3750..4602	β-lactamase (interrupted reading frame !)
5045..5500	phage f1 region
5501..5661	lac operon sequence

5621..5637	pUC /M13 forward primer binding site
5654..5675	T7 promoter

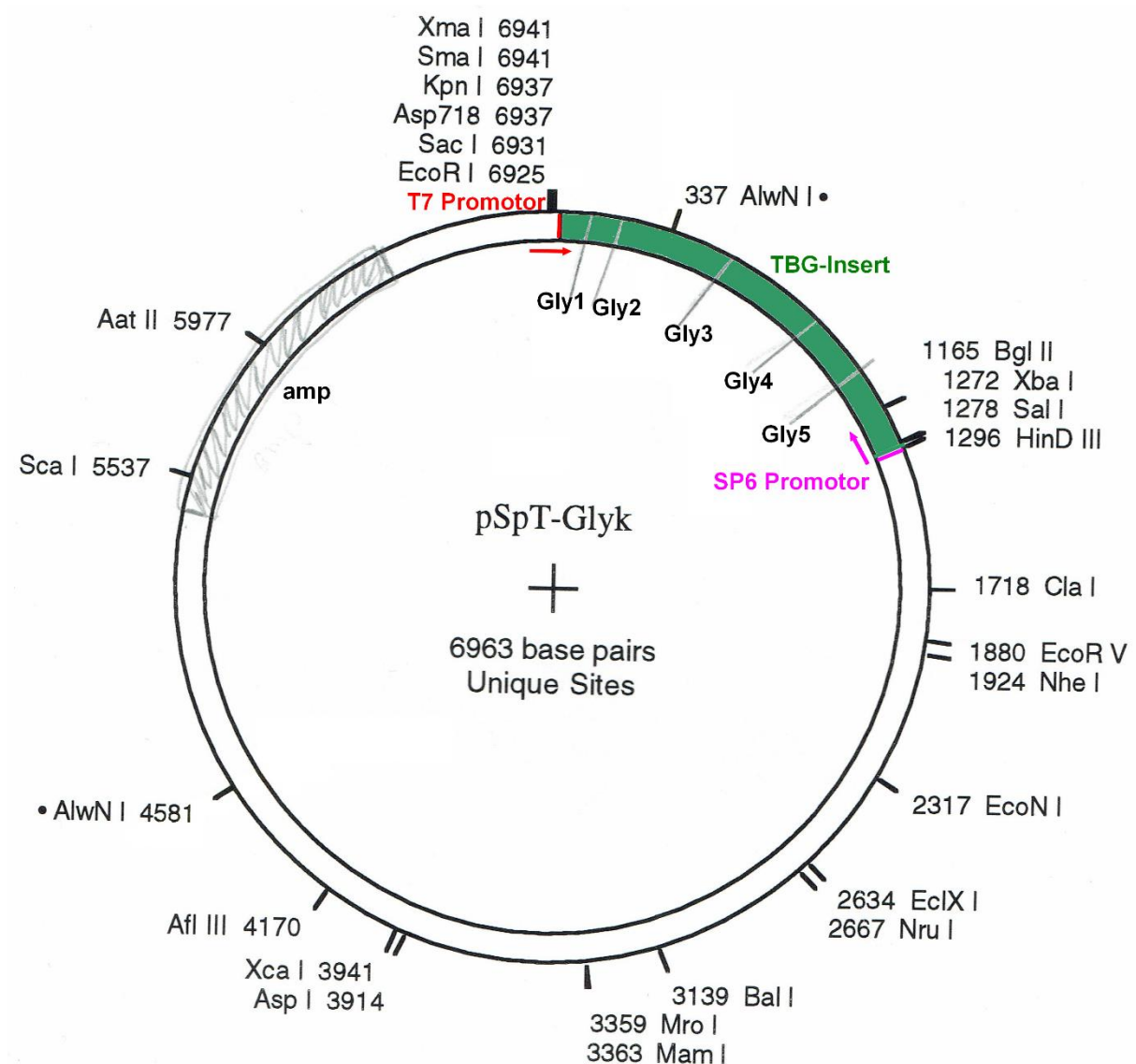


Abbildung 38 pSelect-Vektor mit TBG-Insert

DNA-Sequenz:

```

1  gggcgaattc gagctcggta cccggggatc ctctagagtc gacctgcagg catgcaagct
61  gagtattcta tagtgtcacc taaatagctt ggcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt
121  gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa
181  agcctggggt gcctaattgag tgagctaacc acattaattg cggttgcgctc actgcccgcct
241  ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga
301  ggcggtttgc gtattgggag ctcttcgcgt tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc
361  gttcggctgc ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa
421  tcaggggata acgcaggaaa gaacatgaat taattctcat gtttgacagc ttatcatcga
481  ttagctttta tgcggtagtt tatcacagtt aaattgctaa cgcagtcagg caccgtgtat
541  gaaatctaac aatgcgctca tcgtcatcct cggcaccgct accctggatg ctgtaggcat
601  aggccttggt atgccggtac tgcggggcct cttgcgggat atcgccatt ccgacagcat
661  cgccagtcac tatggcgtgc tgctagcgct atatgcgttg atgcaatttc tatgcgcacc
721  cgttctcgga gcaactgtcg accgctttgg ccgcgcgcca gtccgtgctc cttcgctact
781  tggagccact atcgactacg cgatcatggc gaccacaccc gtccgttgga ttctctacgc
841  cggacgcata gtggccggca tcaccggcgc cacaggtgcg gttgctggcg cctatatcgc

```

901 cgacatcacc gatggggaag atcgggctcg ccacttcggg ctcatgagcg cttgtttcgg
 961 cgtgggtatg gtggcaggcc ccggtggcgg gggactgttg ggcgccatct ccttacatgc
 1021 accattcctt gcggcggcgg tgctcaacgg cctcaacctt ctactgggct gcttcctaata
 1081 gcaggagtcg cataagggag agcgccgacc gatgcccttg agagccttca acccagtcag
 1141 ctccctccgg tgggcgcggg gcatgactat cgtcgccgca cttatgactg tcttctttat
 1201 catgcaactc gtaggacagg tgccggcagg gctctgggtc attttcggcg aggaccgctt
 1261 tcgctggagc gcgacgatga tcggcctgtc gcttgcggtt ttcggaatct tgcacgccct
 1321 cgctcaagcc ttcgctactg gtcccgccac caaacgtttc ggcgagaagc aggccattat
 1381 cgccggcatg gcggccgacg cgctgggcta cgcttgctg gcgttcgca cgcgaggctg
 1441 gatggccttc ccattatga ttcttctcgc ttccggcggc atcggtatgc ccgcgttgca
 1501 ggccatgctg tccaggcagg tagatgacga ccatacaggga cagcttcaag gatcgctcgc
 1561 ggctcttacc agcctaactt cgatcactgg accgctgacg gtcacggcga tttatgccgc
 1621 ctcggcgagc acatggaacg gggtggcatg gattgtaggc gccgccctat accttgtctg
 1681 cctccccgcg ttgcgtcgcg gtgcatggag ccgggccacc tcgacctgaa tggaaagccg
 1741 cggcacctcg ctaacggatt caccactcca agaattggag ccaatcaatt cttgcggaga
 1801 actgtgaatg cgcaaaccac cccttggcag aacatatcca tcgcgtccgc catctccagc
 1861 agccgcacgc ggcgcacttc gggcagcggt gggctctggc cacgggtgcg catgatcggtg
 1921 ctctgtcgtg tgaggaccgc gctaggctgg cggggttgcc ttactgggta gcagaatgaa
 1981 tcaccgatac gcgagcgaac gtgaagcgac tgctgctgca aaacgtctgc gacctgagca
 2041 acaacatgaa tggctctcgg ttccgctgtt tcgtaaagtc tggaaacgcg gaagtcagcg
 2101 ccctgcacca ttatgttccg gatctgcacg gcaggatgct gctggctacc ctgtggaaca
 2161 cctacatctg tattaacgaa gcgctggcat tgaccctgag tgatttttct ctgggtcccg
 2221 cgcattcata ccgccagttg ttaccctcca caacgttcca gtaaccgggc atgttcatca
 2281 tcagtaaccc gtatcgtgag cactctcttc gtttcatcgg tatcattacc cccatgaaca
 2341 gaaattcccc cttacacgga ggcatacagt gaccaaacag gaaaaaaccc ccttaacat
 2401 ggcccgcttt atcagaagcc agacattaac gcttctggag aaactcaacg agctggacgc
 2461 ggatgaacag gcagacatct gtgaatcgct tcacgaccac gctgatgagc tttaccgcag
 2521 ctgcctcgcg cgtttcgggt atgacgggtga aaacctctga cacatgcagc tcccggagac
 2581 ggtcacagct tgtctgtaag cggatgcggg gagcagacaa gcccgctcagg gcgcgtcagc
 2641 ggggtgttggc ggggtgtcggg gcgcagccat gaccagtcga cgtagcgata gcggagtgtg
 2701 tactggctta actatgcggc atcagagcag attgtactga gagtgcacca tatgcggtgt
 2761 gaaataccgc acagatgcgt aaggagaaaa taccgcatca ggcgctcttc cgcttccctg
 2821 ctactgactc cgctgcgctc ggtcgttcgg ctgcggcgag cggatatcagc tcaactcaaa
 2881 gcggtataac ggttatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa
 2941 ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaaa gccgcgttgc tggcggtttt ccataggctc
 3001 cgcccccttg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaaccgcaca
 3061 ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tctgttccg
 3121 accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccttc gggaaagcgtg gcgctttctc
 3181 atagctcacg ctgtaggatc ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg
 3241 tgcacgaacc cccggttcag ccgcaccgct gcgccttata cggtaactat cgtcttgagt
 3301 ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca
 3361 gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca
 3421 ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag
 3481 ttggtagctc ttgatccggc aaaaaaacca ccgctggtag cggtgtttt tttgtttgca
 3541 agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgacg ttttctacgg
 3601 ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gtttaaggat tttggtcatg agattatcaa
 3661 aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatac atctaaagta
 3721 tatatgagta aactttgggt gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag
 3781 cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga
 3841 tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac
 3901 cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc
 3961 ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta
 4021 gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc ggcacgtgg tgtcacgctc
 4081 gtcgtttggg atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc
 4141 ccccatgttg tgcaaaaaag cggtttagctc cttcgggtcct ccgatcggtg tcagaagtaa
 4201 gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat
 4261 gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata
 4321 gtgtatgcgg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaaca ccgggataata ccgcgccaca
 4381 tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag
 4441 gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccactc cgtgcacca actgatcttc
 4501 agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acagggaaggc aaaatgccgc
 4561 aaaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata

```

4621 ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatattg aatgtatttta
4681 gaaaaataaaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtcta
4741 agaaaccatt attatcatga cattaaccta taaaaatagg cgtatcacga ggccctttcg
4801 tctcgcgcgt ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggt
4861 cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg
4921 tgttggcggg tgcgggggct ggcttaacta tgcggcatca gagcagattg tactgagagt
4981 gcaccatatg cgggtgtgaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc gcatcaggcg
5041 aaattgtaaa cgттаатatt ttgttaaaat tcgcgtaaat atttgttaaa tcagctcatt
5101 ttttaaccaa taggccgaaa tcggcaaaat cccttataaa tcaaaagaat agaccgagat
5161 aggggttgagt gttgttccag ttgggaacaa gagtccacta ttaaagaacg tggactccaa
5221 cgtcaaaggg cgaaaaaccg tctatcaggg cgatggccca ctacgtgaac catcacccaa
5281 atcaagtttt ttgcggtcga ggtgcgtaa agctctaaat cggaacccta aagggagccc
5341 ccgattttaga gcttgacggg gaaagccggc gaacgtggcg agaaaggaag ggaagaaagc
5401 gaaaggagcg ggcgctaggg cgctggcaag tgtagcggtc acgctgcgcg taaccaccac
5461 acccgccgcg cttaatgcgc cgctacaggg cgcgtccatt cgccattcag gctgcgcaac
5521 tgttgggaag ggcgatcggg gcgggcctct tcgctattac gccagctggc gaaaggggga
5581 tgtgctgcaa ggcgattaag ttgggtaacg ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaaa
5641 acgacggcca gtgaattgta atacgactca ctata

```

Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide für die gerichtete Mutagenese zur Mutation der Glykosylierungsstellen im TBG-Gen, jeweils von Asparagin (AAT oder AAC) nach Glutamin (CAA). Die für die Mutationen veränderten Basen sind rot markiert und unterstrichen.

Nr	Name	von -> nach	Sequenz
1	mGly1	AAT -> CAA	5'- TCA TCC CAA CCA <u>CAA</u> GCC ACT CTC TAC -3'
2	mGly2	AAC -> CAA	5'- ACC TTG GGG TTC <u>CAA</u> CTC ACA GAC ACT -3'
3	mGly3	AAC -> CAA	5'- ACC GAC TTC TCC <u>CAA</u> ATT TCT GCA GCC -3'
4	mGly4	AAC -> CAA	5'- GAT ATG GAA TTG <u>CAA</u> TGC ACA GTT CTG -3'
5	mGly5	AAC -> CAA	5'- GGG AAA GTT GTG <u>CAA</u> CCA ACG GAA GCG -3'

Abbildung 39 Oligonukleotide für die Mutagenese der N-Glykosylierungsstellen des TBG

TBG-Gen (synonym: SERPINA7; TBGQTL)

chromosome: GRCh38:X:106031835:106039327:-1, TBG
gelb: Exon (ensembl.org 2020)

```

CCTTGACTCCTTCTGCATCCTCTTTTGGAGTCCTGTGGCCAGGGGACGGTACAGGGAATT
TTAATGACGAGAAGACAGGGCTGGTTTCCCCCTTAGCAGACATATATGTTTGCAGCATCA
GAAGTCTAGGGCTGGAAGCTACCTTTGACATCATTTTCTCTGCGAATGCATGTATAATTT
CTACAGAACCTATTAGAAAGGATCACCCAGCCTCTGCTTTTGTACAACCTTTCCCTTAAAA
AACTGCCAATTCCACTGCTGTTTGGCCCAATAGTGAGAACTTTTTCTGCTGCCTCTTGG
TGCTTTTGCCTATGGCCCCTATTCTGCCTGCTGAAGACACTCTTGCCAGCATGGACTTAA
ACCCCTCCAGCTCTGACAATCCTCTTTCTCTTTTGTGTTTACATGAAGGGTCTGGCAGCCA
AAGCAATCACTCAAAGTTCAAACCTTATCATTTTTTGTCTTTGTTCTCTTGGCCTTGGTT
TTGTACATCAGCTTTGAAAATACCATCCAGGGTTAATGCTGGGGTTAATTTATAACTAA
GAGTGCTCTAGTTTTGCAATACAGGACATGCTATAAAAAATGGAAAGATGTTGCTTTCTGA
GAGATGCAGGTGGATTCTTGGGCATTGTCTGTAAGTACTTTTTTCTCTTTGGAAACTTT
GAACATCTCTATCAGCAAGTCAGAGTCCCAAATAACCAAGTTGGCAAGTCAGAGTCCCAA
ACCAAATTCCTGGCTCTAGGGGTGAAGGTCTAAGTGTGGTCATCTAATAATTGACTTTCT
ACCAGCCTCAGTGACTTTTAAAGAAAGAGGACTCTGATGATGATATGGAGATTGGATAGA
GTGGTGAACAAAGGGGGTTGGTATGGAGGATATAGGAGATGGTGTGATCTGTTAGGAGCT
GATATAGTAGCTCAGGCCATGAAGTGAAGAGGCAGAGGCAGCAGGAATGAAGAGAAGGGAG
AAGTTTTGAGAGTTATTTAAGAGTTAGTATTCATAAGACATCATGCTTCATTAGATATGG
GGAATGAGAATAAAAGGAGGCTATGATTATCCCAGGTATCTGGCTTAGGTGTCTCTATA

```

GACAGTGATGTGATAAACTGAGATGTGGAATGAAGATGAGGGAGCAAGCTTAAGGTGTAG
GGAGATGATATGTTTACATCTGGCAACTTTGAGATTTTCTTATTGAGACTGAGGTCTGTG
TGGACCATCCTGGTGGTTATATCCAAAAGAAAGCTGGATAAATGGCTAGGAGCTCAGGAG
AGCAATCTGAGAGAGATACAGTTTCTAGCAATTGAGTGCGGAGGGTAAGATCACTCAGGA
AGAAGATGGAGGGTGGAGGAAGGATCCTTTTTCTGAGTTCATAGACCTCTTCCTTCTAAG
CACACATGTCCACTTTTCATTGGATTTCCACACCTGACTTCTTTACTCCATTTCTTTGCAC
TCTTTCAGGATCAGAGAACCTTACACCTTATCTTTCTGGCTTTCTTTATAATAATTAATA
GTAACATGCATAGGTGTAAGAATAATAGTGTTAAGATGTCTTACAACCTAGAAATGACTG
TTTAGATGTTACTAAGATTAATGGTGAAAGAAATGTAAAATTTAGAAAATTATCTTTCA
TTTTCTGGTTGTTTCGAAAATACCTCTATGGCTTCCATGCATTGCAAAATGCATGAATTC
AGCTCATGACCTTGACGTGGCTCCATAAACCACCACCCATCCATTCCAACCTAATCATAT
ATTGTACAAATTACTTTTCATTTTTGTCTTTTAGCCAAATAAGATGCGAGTGTTCTCTCATC
TCATAGATTTTATCTTAAGAAAATGCCAGATGAAAAAAAAAATCTAAAATTCTAATCTAC
AATGAATAATGTATACAGAGGGAGTACTAGTTTAACCTAAGAATATCCCTCTCTCCAAA
AGGCTGCCTCTAG**TTCAAGAAAAAGTGATTCAATTTCCATAAAATTTAATTTACTCACAG
CGTTTTTCATAATGTTGCTATAACATCTGAATGACAGTCCATGGCATTATTTCCGTGGTTG
CAGCAAGCCACTTCTCCTACTCCCTGTCCATATTAGATGCATCTCCTGTTTTTCAAGGGA
GAGAAACCCCTGCTCAGCCCCTGATGAGCACATCATCAATATTTACTATTGTTTTATTA
ATCAATGTGGGTGGTTATTATGTGTCTCTGGCTCAGGGAGTGTTTCATCCAACCTAAGCTC
CCTCAGTGGTTGTCTCACTTCATCTCTTATAGATTAACTTCCTTCCAAAATGTCACCATT
CCTGTATCTGGTTCTCTTGGTACTTGGGCTTCATGCTACAATCCACTGTGCATCACCTGA
AGGCAAAGTAACAGCCTGCCATTATCCCAACCAAATGCCACTCTCTACAAGATGTCATC
CATTAAATGCTGACTTTGCATTCAATCTGTACCGGAGGTTCACTGTGGAGACCCAGATAA
GAACATCTTCTTTTCCCTGTGAGCATTCTGCAGCTTTGGTTATGCTTTCCTTTGGGGC
CTGCTGCAGCACCCAACTGAGATTGTGGAGACCTTGGGGTTCAACCTCACAGACACTCC
AATGGTAGAGATCCAGATGGCTTCCAGCATCTGATCTGTTCACTGAATTTTCCAAAGAA
GGAAGTGAATTGCAGATAGGAAATGCCCTCTTCATTGGCAAGCATCTGAAACCACTGGC
AAAGTTCTTGAATGATGTCAAGACCCTCTATGAGACTGAAGTCTTTTCTACCGACTTCTC
CAACATTTCTGCAGCCAAGCAGGAGATTAACAGTCATGTGGAGATGCAAACCAAAGGGAA
AGTTGTGGGTCTAATTCAGACCTCAAGCCAAACACCATCATGGTCTTAGTGAACTATAT
TCACTTTAAAGGTAAGACTTTTTCAGATGTCAATTTTTCAGTCTAGGGCTCAGATACTTGGGT
GGAGTGCTGAGGGGAGCTCATGGTCTCTTATTACTGGCATCAGTAGGTGTCCCTCATACC
ACAGTGATCTGCTCCACTGGACATAGCTGTGAATAGTATTGGATCTTCCAAGATGGACAC
ACAGCTCTGTGAATGAGTCCAGGAAATTTCTAGGGAGAGCGCCCTTTCAGAGAGGTGGGT
GACAATGGTATGAACATCTTGCTCATAATTGGCTAAAGATTTCATGGTTTCCAAAAGATTT
GGTGAGGTGGGACAAGCTTGCACTTGTCAAGTAGACATATTTGTATGTAAAGCCTACTGT
GATTCTCACTTGCTGTACATACTTAGGCATGTTACATACATAATTTTACCATGTATTATG
CACTCACTGTGTACTAAACACCATCTGACATGTGTGGTATACACACACTGTCTCAATCAA
TACTCATAAGTGTCAGTTTACACAGTTAATAAGTTTTAGAACTGATATTACCAACAAG
GTCTGTGTGAGTCTAAAGCTGGTGCTGTAGAAACAAGAATCATGTGACTATTTCTTAAA
GGTACTGTGCTCAAATGATTTCTCCTGGTTCTATAGTATATGTCAGCCACATTTCTTGGA
GGAGTAATCAATTGTGCGCCACAAACCACACATAGATAGATTGGCTAAAATTGCAGAAC
GATCTGTTTTCTCACTTCTCCCTAGTGTGTGGATGTGCTTATACCTTTTTATGGAAGAG
GAACTATGGCTCTGATGGCTTAGTGTGGTATAGTATAGTTTTGAATACAGACTGTGGAGC
CCAACAGCCCTGGGTATGATTCTGGCTCTGCCACCTGTTAACTGGGAGACCATGACAAA
TGACTTTCTCTGCCTGATCCTCAGTCACTTGTAAAATGGTTGACTGTAGGTACCTAACT
CTGTGGTGATCTTAATTTCTAAATGAAATCACTAATGGAAGAGGTCTTGTGGTACTGAT
ACCGGTTTTAAATAAACACCTCTCTTTTCTTTGTATTTTAAAG**CCCAGTGGGCAAATCCTT
TTGATCCATCCAAGACAGAAGACAGTTCCAGCTTCTTAATAGACAAGACCACCACTGTTT
AAGTGCCCATGATGCACCAGATGGAACAATACTATCACCTAGTGGATATGGAATTGAACT
GCACAGTTCTGCAAATGGACTACAGCAAGAATGCTCTGGCACTCTTTGTTCTTCCCAAGG
AGGGACAGATGGAGTCAGTGAAGCTGCCATGTCATCTAAAACACTGAAGAAGTGAACC
GCTTACTACAGAAGGG**GTAATGCCTTAGAGGATGTGTGGGTGGAAGGTGGGCATAAAAG
TGCAGGTGAGACAGAGTTCAGCAGAAACCCAGAGGCAGAAGAATCACCTGAACCTACCCA
ACAGCTATGTATGATCACTAGAATATGCCAAGAAAATACTGTCTACCAGGCCCTTGGCTG
GGCATTCTACATACTTCATATCATCCAAGCACATCAACAAACCTACAAAGGAGGCAGTAT
AATTGGCATTTTTCAAATTAGGAAGTCTGGTCTTGAAAGATAAGATGAGCTCCCCAAAGT
CAGCCTATTAGTAAATTGATGGCTTCTGTAGACCAACTAGAGCTCAAAGAACAGGTG
ATTTTGATGTTGAAAGGTGATTGGGCAGCCACTCTGTACTGGAAGTGCAAGGCAGAAAAC
TGTGAAGCTCCTGGGTGCTACCCATTAACTTCATGCCACTAGCTCCCCAACCTTGGTCG
TCACCTCAGGGATATTTTCTCTTGATTATAAAGGAGTTACATCTCCCTACTCCCAGTGCT
TCAGTCCAACATTGGCTGTACCTGAGTGCATTCCCTTTCAGAATAACTTCTGTGAGTTTGG**

TGCCATGTATTGACTTACATAGTAATGGTTATCAATACTCAGGGAAGAAGCAGAGTCCAA
TATAATACCATCATGAGAGAGAGAAGGAGAGAATCATAAGCTTGATATGGTGATTGCCAT
GTGTTCCCTTCTCTTTTCCACAG**ATGGGTTGACTTGTGTTGCCAAAGTTTTCCATTT**
CTGCCACATATGACCTTGGAGCCACACTTTTGAAGATGGGCATTGAGCATGCCTATTCTG
AAAATGCTGATTTTTCTGGACTCACAGAGGACAATGGTCTGAAACTTTCCAATGTAAGTT
GATAAACTAGAGTTCTTAAATGTATGAACTGGAAGAGCAATTAGGAGTCAATTGATTCAA
CTTTCTTATTTTACCAATTAGCAATCTGATGCCTAGAGAGGCGGTGTGACTCCTCCTAAG
CTAGAATCACTCCAGAGTCATTCCCATTACTCCAAATAAGTAATTGTATCAGTTTCTTCC
ATCCTTGACCTTTATGTCCCAGAATTACTCTGATAGAACAGCTTAATGATCAGAAGTGAC
TCTGGTGAGATGCAGTTCTGAAGGAGGTGTGAGGAGGAATGCTTAAGAGGTGACTCCTG
GCGGCAGCAGGCCATAGTGAATGAGGTGTTTCCCAATGGCTAGCCGTAGAATCGCCAGAG
AATGATTGACTACATTTAGCAGAGGAACTTCATATTCTAGCACCATCAACATAGTATAG
CAAAGGGGCGGCCACCTTTTCTTTTCCCTTTCTTACTTCTAG**ACCTTCCCAAAGACTGT**
TCCTGTTTCTTCAGAGACCCGAGGATTTGTTCTCCCCACACAGGCTGCCATAAGGCTG
TGCTGCACATTGGTGAAAAGGGAAGTGAAGCTGCAGCTGTCCCTGAAGTTGAACTTTCGG
ATCAGCCTGAAAACACTTTCCTACACCCTATTATCCAAATTGATAGATCTTTCATGTTGT
TGATTTTGGAGAGAAGCACAAGGAGTATTCTCTTTCTAGGGAAAGTTGTGAACCCAACGG
AAGCGTAGTTGGGAAAAGGCCATTGGCTAATTGCACGTGTGTATTGCAATGGGAAATAA
ATAAATAATATAGCCTGGTGTGATTGATGTGAGCTTGGACTTGCATTCCCTTATGATGGG
ATGAAGATTGAACCCTGGCTGAACTTTGTGGCTGTGGAAGAGGCCAATCCTATGGCAGA
GCATTGAGAATGTCAATGAGTAATTCATTATTATCCAAAGCATAGGAAGGCTCTATGTTT
GTATATTTCTCTTTGTGAGAATACCCCTCAACTCATTGCTCTAATAAATTTGACTGGGT
TGAAAATTTTCCCTTTTCTGTCTTCTGGGGAATAGCTAAAAAGCAGGTGAGGTCTTCGT
ATCCCAGTACTCCAATAAGATCAATGGACATAAAACAATGCAGATGCATTGTCTTATATG
TGAATTTCTCAACCCCTTCCCCTGTCCCATTAGTAGGATTCTCTGAGTTCTTGCCAGA
TCTGACACTGGTAGGTTGAATAAAGGAATCCCCTATGGGGATGAGTTACAGACTGAGA
CAACTGAACAAGTTACTGAACAAGCATGGGACAATACAGCAAGAGATAAACTTGCCTGTC
CAACCCACCTTCCCCCAAGAAAACATACTTCCACCTTGCCAATGTATAAGCTGGGAGT
GGAGAAAGAAAGTAATTCATTCATGTATATCTCATAGACCTCTTTTTCTGTATCCCAA
TCAGACTCCTTTCCATATATAGCACCCCTGTCCCCTTGTTTAAGTAGGAATCTCCTTTT
TGGCTCTAATTTCACTGAATATTGGTACTTTTGTATCCCAGATCCTTCAACAACCTTCC
CTCTACCTGTACATGCCAACTCATTACCACCTACCAAAGTAGATTTTATTTTACAGACCTA
TGTATTTAAAGCTTGAGTATAAATGGCACAGTGAGTGGTAATGATGTAGTATCTGAAAT
CTAGCCCTGAGGTAAAACACTTCAGTGACAGGAAAATAGTAAAAAAATGCATAAGTACT
GTTGCAGATGTTGTACTTCCATATTGAAATAAATATTTATGTTTAGAAAAGCATGTGTAT
TACAAACATTCTAATTTTTTCTGATTAGACCCATTTGCATGGAAGTTTGTATTTCCTGG
TATAGTTCACACTTTGCTTTTGTGTAAGCAATTTTTGAAGCCAGAGCAGAATCTCTGGT
ACAAAAATTCATTGTTAATGAGGTTGTGTTTCACTAAAGTTACATTACAATCCTGGCC
CTGCTACTTAGTGTTTGGTGATCTTGGACAAGGCACTTAAACCCTGTACCTTATTTTCTT
CATCTGTAAATGGGAACAATAAGAATATCCATGTCATTGGGATTTTGTGAACCTTCAAT
GTTGCAAAGCAGGTAGCATGTAATATGCTCATCACAGAGCCTGAGACCTGATAAAAAGCC
CTGTAAATATTAGTTGTTTCAATCATGTTGGTCAACACCAGACAGTGGGCTGGTATCAGA
ACCAGGATTGTAATGTGAGTCTCTTGATTTGCGGGTTTCTGTTCTCTAGCTCAGGCTCTA
CCTCCAGAGGCCAGAGTAAATGTAAATATCAACTCCTTCCCTACCCCTACCGTCCAAATG
AGTTCCATCAGAACTTGTTCTGGAAGGAATATCAGTATCTTCAGAGGGAAGTC

Signalpetid: Basen 48 bis 107

Reifes Protein: Basen 108 bis 1292 (= 395 Triplets/Aminosäuren)

cDNA – Sequenz von TBG

1	gagatgcagg	tggaattcttg	ggcattttgct	attaacttcc	ttccaaaatg	tcaccattcc
61	tgtatctggg	tctcttggta	cttgggcttc	atgctacaat	ccactgtgca	tcacctgaag
121	gcaaagtaac	agcctgccaat	tcatcccaac	caaagtcac	tctctacaag	atgtcatcca
181	ttaatgctga	ctttgcatcc	aatctgtacc	ggagggtcac	tgtggagacc	ccagataaga
241	acatcttctt	ttcccctgtg	agcattttctg	cagctttggg	tatgctttcc	tttggggcct
301	gctgcagcac	ccaaactgag	atttgtggaga	ccttgggggt	caacctcaca	gacactccaa
361	tggtagagat	ccagcatggc	ttccagcatc	tgatctgttc	actgaatttt	ccaaagaagg
421	aactggaatt	gcagatagga	aatgccctct	tcattggcaa	gcactctgaa	ccactggcaa
481	agttcttgaa	tgatgtcaag	accctctatg	agactgaagt	cttttctacc	gacttctcca
541	acatttctgc	agccaagcag	gagattaaca	gtcatgtgga	gatgcaaacc	aaagggaagg

```

601 ttgtgggtct aattcaagac ctcaagccaa acaccatcat ggtcttagtg aactatattc
661 acttttaaagc ccagtgggca aatccttttg atccatccaa gacagaagac agttccagct
721 tcttaataga caagaccacc actgttcaag tgcccatgat gcaccagatg gaacaatact
781 atcacctagt ggatatggaa ttgaactgca cagttctgca aatggactac agcaagaatg
841 ctctggcact ctttgttctt cccaaggagg gacagatgga gtcagtggaa gctgccatgt
901 catctaaaac actgaagaag tggaaaccgt tactacagaa gggatgggtt gacttgtttg
961 ttccaaagtt ttccatttct gccacatatg accttggagc cacacttttg aagatgggca
1021 ttcagcatgc ctattctgaa aatgctgatt tttctggact cacagaggac aatggtctga
1081 aactttccaa tgctgcccac aaggctgtgc tgcacattgg tgaaaaggga actgaagctg
1141 cagctgtccc tgaagttgaa ctttcggatc agcctgaaaa cactttccta caccctatta
1201 tccaaattga tagatctttc atgttggtga ttttggagag aagcacaagg agtattctct
1261 ttctagggaa agttgtgaac ccaacggaag cgtagttggg aaaaaggcca ttggctaatt
1321 gcacgtgtgt attgcaatgg gaaataaata aataatatag cctgggtgtga ttgatgtgag
1381 cttggacttg cattccctta tgatgggatg aagattgaac cctggctgaa ctttgttggc
1441 tgtggaagag gccaatccta tggcagagca ttcagaatgt caatgagtaa ttcattatta
1501 tccaaagcat aggaaggctc tatgtttgta tatttctctt tgtcagaata cccctcaact
1561 catttgctct aataaatttg actgggttga aaaattttcc cttttctgtc ttctggggaa
1621 tagctaaaaa gcaggtcagg tcttcgtatc ccagtactcc aataagatca atggacataa
1681 aacaatgcag atgcattgtc ttatatgtga acttctcaac ccccttccca ctgtcccatt
1741 agtaggattc tctgagttct tgccagatct gacactggta ggttgaataa aggaactccc
1801 actatgggga tgagttacag actgagacaa ctgaacaagt tactgaacaa gcatgggaca
1861 atacagcaag agataaactt gcctgtccaa cccacacctc cccccaagaa aacatacttc
1921 caccttgcca atgtataagc tgggagtggg gaaagaaagt aattcattca tgtcatatct
1981 catagaccct ctttttctgt atcccaatca gactcctttc catatatagc acccctgtcc
2041 cacttgttta agtaggaatc tccttttttg ctctaatttc actgaatatt ggtacttttg
2101 tatccccaga tccttcaaca accttcctc tacctgtaca tgccaactca ttaccaccta
2161 ccaaactaga ttttatttca gacactatgt atttaaagct tgagtataaa tggcacagtg
2221 agtggtaatg atgtagtatc tgaaattcta gccctgaggt aaaacacttc agtgacagga
2281 aaatagtaaa aaaaatgcat aagtactgtt gcagatgttg tacttccata ttgaaataaa
2341 tatttatgtt tagaaaagca

```

//

Proteinsequenz von TBG

thyroxine-binding globulin precursor: Protein-ID=[NP_000345.2](#), CCDS:[CCDS14518.1](#);
GeneID:[6906](#); HGNC:[HGNC:11583](#); MIM:[314200](#) (NIH.gov 2020)

Signalpeptid

1 MSPFLYLVL VLGLHATIHC

reifes TBG (ohne Signalpeptid)

21 ASPEGKVTAC HSSQPNATLY KMSSINADFA FNLYRRFTVE TPDKNIFFSP

71 VSISAALVML SFGACCSTQT EIVETLGFNLTDTPMVEIQH GFQHLICSLN FPKKELELQI GNALFIGKHL

141 KPLAKFLNDV KTLYTEVFS TDFSNISAAK QEINSHVEMQ TKGKVVGLIQ DLKPNTIMVL VNYIHFKAQW

211 ANPFDPSKTE DSSSFLIDKT TTVQVPMMHQ MEQYYHLVDM ELNCTVLQMD YSKNALALFV

281 LPKEGQMESV EAAMSSKTLK KWNRLQKGW VDLFVPKFSI SATYDLGATL LKMGIQHAYS ENADFSGLTE

351 DNGLKLSNAA HKAVLHIGEK GTEAAVPEV ELSDQPENTF LHPIQIDRS FMLLILERST RSILFLGKVV

421 NPT^{EA}

Gelb markiert: N-Glykosylierungsstellen (N – X – A/T)

6.4 Bezugsquellen

¹²⁵J-Thyroxin (NEX-111H)

12-Well Zellkultur-Platten

DuPont, Bad Homburg v.d.H.

Baxter, Unterschleißheim

¹⁴ C-Rainbow Marker	Amersham, Braunschweig
³⁵ S-dATP	Amersham, Braunschweig
3mm-Whatman-Papier	Whatman, Kent, England
40%iges Acrylamid, PAGE- und IEF-Grade	Pharmacia, Freiburg
50ml Röhrchen mit Schraubverschluß	Falcon
ABI Prism	Pharmacia, Freiburg
Agarose MP	Boehringer Mannheim, Mannheim
Alkalische Phosphatase	Boehringer Mannheim, Mannheim
Altered-Sites-Mutagenese-Kit	Promega/Serva, Heidelberg
Amberlite IRA-400 (16-50mesh)	Mallinckrodt
Ampholine pH 4-6,5 (für IEF)	Pharmacia, Freiburg
Ampicillin (Na-Salz)	Appligene, Heidelberg
ATP (Li-Salz)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Autoklav	Tecnomara, Bad Homburg
Barbital Buffer	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
Borsäure	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
Bromphenolblau	Boehringer Mannheim, Mannheim
BSA (Fraction V)	Promega/Serva, Heidelberg
BSA (mol. biol. grade)	Boehringer Mannheim, Mannheim
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
Canine Microsomal Membranes	Promega/Serva, Heidelberg
Chloroform	Baker, Phillipsburg, USA
Cichlid-Staples (Froschfutter)	Tetra, Melle
Collagenase	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
Dithiothreitol	Promega/Serva, Heidelberg
Dnase I (RNase frei)	Boehringer Mannheim, Mannheim
<i>E.coli</i> BMH 7118 mut S	Promega/Serva, Heidelberg
<i>E.coli</i> JM109, 7G(5')ppp(5')G (Na-Salz)	Promega/Serva, Heidelberg
Entwicklungschemikalien	Agfa, Leverkusen
Ethanol	Baker, Phillipsburg, USA
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Filmentwickler Curix 160	Agfa, Leverkusen
gefrorene Rote Mückenlarven	Tetra, Melle
Geltrockner SGD 4050	Savant, Farmingdale, USA
GeneClean	Bio101/Dianova, Hamburg
Gentamycin	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
Glas- und Laborglasgefäße	Brand, Wertheim; Schott Glaswerke, Mainz
Glaskanülen für die Mikroinjektion	Bachhofer, Reutlingen
Glaskapillaren und Microdispenser	Firma Drummond (Bachofer, Reutlingen)
Glycerin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt

Hefeextrakt	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
HEPES	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
horizontale Proteinelektrophoresekammer	Bio-Rad GmbH, München
Inkubator	Heraeus (Labor Schubert, München)
Intensifying Screens	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Baker, Phillipsburg, USA
Isopropoanol	Merck, Darmstadt
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kanülen Nr. 18	Terumo, Leuven, Belgien
Kassetten für die Autoradiographie	Kodak über Sigma, Deisenhofen
KL 1500	Leica
Kodak Biomax Filme	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
Kühlfalle	Savant, Farmingdale, USA
Kühlzentrifuge und Zentrifugenröhrchen	Sorvall/DuPont, Bad Homburg
Lambda-HindIII-Marker	New England Biolabs, Schwalbach
Liquid Szintillation Analyzer 1450 Wizzard	Wallac/Berthold, München
MgSO ₄	Merck, Darmstadt
Mikromanipulator	Bachhofer, Reutlingen
Mikroskop M3Z	Wild, Heerbrugg
Mineralöl	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
MnCl	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
MOPS	Boehringer Mannheim, Mannheim
N,N,N',N'Tetramethylethylenediamin	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
NaCl	Merck, Darmstadt
Natrium-Pyruvat	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
Nuclease-freies Wasser	Promega/Serva, Heidelberg
Oligonukleotide	Mikrogen GmbH, München, und MWG Biotech, Ebersberg
Orbitalshaker	Kleinfeld, Hannover
PBS (phosphor-buffered saline)	Gibco BRL, Eggenstein
Petrischalen (10cm)	Hereus
Phenol	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
pH-Meter pH Digi 510	Wiss.-Technische Werkstätten, Weilheim
Pipetten Puller Typ 462	Bachhofer, Reutlingen
Polaroidfilme Typ 667	Sigma, Deisenhofen
pSelect-Vector	Promega/Serva, Heidelberg
Rabbit Reticulocyte Lysate	Promega/Serva, Heidelberg
Reagiergefäße von 0,5 bis 2ml	Eppendorf NethlerHinz, Hamburg

Resin Amberlite IRA-400	Mallinckrodt, Paris
redivue- ³⁵ S-Methionin	Amersham, Braunschweig
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
RNAasin (animal injectable grade)	Promega/Serva, Heidelberg
RNTPs	Pharmacia, Freiburg
Sephacryl S-300 HR-Säulen	Pharmacia, Freiburg
Sequenase	USB/Amersham, Braunschweig
Sigmacote	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
Spektralphotometer DU 62	Beckman, Sommerset, USA
Standkamera MP4	Sigma, Deisenhofen
Sterilfilteraufsätze (0,45µm	Millipore, Watford, U.K.
Synthetische Oligonukleotide	Mikrogen, München und MWG Biotech, Ebersberg
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Schwalbach
T4 DNA-Polymerase	New England Biolabs, Schwalbach
T4 Polynukleotid-Kinase	New England Biolabs, Schwalbach
T7 RNA-Polymerase	Promega/Serva, Heidelberg
T7 mMessage mMachine	ThermoFisherScientific, Waltham/M., USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifugen 5415 C	Eppendorf, Hamburg
TRIS Base (Ultrapure)	Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen
UV-Tisch (302 nm)	Bachofer, Reutlingen
Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
vertikale Gelelektrophoresekammern	Firma MWG Biotech, Ebersberg
Wasseraufbereiter Aqua Safe	Tetra, Melle
<i>Xenopus laevis</i> -Weibchen	Horst Kähler, Hamburg

7 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
allGly	Mutante, die überhaupt keine potentielle Glykosylierungsstelle mehr trägt
Ampicillin	D-(-) α -Aminobenzylpenicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AT	Antitrypsin
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosin-Monophosphat
CBG	Corticosteroid-bindendes Globulin
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CMM	Canine Microsomal Membranes (mikrosomale Pankreasmembranen vom Hund)
cpm	counts per minute, Zerfälle pro Minute
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycythydintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA, -Na	Ethylendiamintetraacetat, Natriumsalz
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IE	Internationale Einheit
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton, Molekulargewicht
M	Molarität
mA	Milliampere

mcs	multiple cloning site, multiple Klonierungsstelle (Polylinker) synthetisch hergestelltes Oligonukleotid, das jeweils singuläre Schnittstellen für mehrere Restriktionsenzyme aufweist und in Vektoren eingebaut wird
mGly1	Mutierter pSelect®-Klon, bei dem in der cDNA-Sequenz des humanen TBGs die erste potentielle N-Glykosylierungsstelle zerstört wurde
mGly2, mGly3...	wie mGly1, aber die zweite/dritte... potentielle Glykosylierungsstelle fehlt
min	Minuten
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
OD ₅₄₀	Optische Dichte, gemessen bei 540 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly-A	poly-Adenylat
Primer	Synthetisch dargestelltes Oligonukleotid zur Initiation der <i>in vitro</i> - DNA-Synthese, z.B. in der PCR oder in der <i>in vitro</i> -Transkription
pSpT	pSelect-Vektor® (Promega/Serva) mit der cDNA-Sequenz des humanen TBGs als Insert (s. Karte)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat, Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	PAGE unter Zusatz von SDS, denaturierende Gelelektrophorese
ssDNA	single stranded (einzelnsträngige) DNA
T ₃	Triiodthyronin, O-[4-Hydroxy-3-iodphenyl]3,5-diiod-L-
T ₄	Tetraiodthyronin, (3-[p-(p-Hydroxyphenoxy)-phenyl])-L-
TAE	TRIS-Acetat-ETDA-Puffer
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin

TE	(s. Lösungen)
TYM	(s. Lösungen)
TYP	(s. Lösungen)
TEMED	N, N, N', N''-Tetramethylethyldiamin
TPO	Thyreoperoxidase
TRH	Thyreotropin-releasing hormone
TRIS	Tris (hydroxymethyl)aminomethane
TSH	thyreoideastimulierendes Hormon
u	Unit
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute (rpm)
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vh	Voltstunden
VT	Volumenteile

8 Abbildungsverzeichnis

Alle Abbildungen wurden, soweit nicht anderes angegeben, selbst erstellt, chemische Formeln mit ChemSketch von ACD Labs.

Abbildung 1 Von der DNA zur RNA bei Eukaryoten	11
Abbildung 2 E. coli - Bakterium	12
Abbildung 3 Die glykosidische Bindung.....	13
Abbildung 4 Glykosylierung eines IgG-Moleküls.....	15
Abbildung 5 Eine N-glykosidische Bindung	16
Abbildung 6 Entstehung der N-glykosidischen Modifikationen.....	17
Abbildung 7 Glykanstrukturen in N-glykosidischen Glykoproteinen	17
Abbildung 8 T ₃	20
Abbildung 9 T ₄	20
Abbildung 10 3,3'-T ₂	21
Abbildung 11 Umwandlungen der Schilddrüsenhormone durch Deiodasen	22
Abbildung 12 Wirkorte von Schilddrüsenhormonen im Überblick.....	23
Abbildung 13 Grundstruktur eines nativen Serpin A-Moleküls	25
Abbildung 14 Serpinstrukturen im Vergleich	27
Abbildung 15 TBG mit T ₄	29
Abbildung 16 Austausch der Aminosäuren	32
Abbildung 17 pSelect-Plasmid mit TBG-Gen	33
Abbildung 18 Herstellung von ssDNA für die Mutagenesereaktion	34
Abbildung 19 Anlagerung der Mutagenese-Oligonukleotide erzeugt Mutationen	34
Abbildung 20 Sequenz von mGly1, ein mutagenes Oligonukelotid	35
Abbildung 21 mutierte und nicht mutierte Sequenz der Glykosylierungsstelle 3	36
Abbildung 22 Kontrollsequenzierung von mGly1 über die zu verändernde Stelle hinweg	37
Abbildung 23 Sequenzierung der TBG-Mutante mGly5 mit ABI Prism	38
Abbildung 24 Polaroidbild eines Agarosegels	39
Abbildung 25 Agarosegel der DNA zur Kontrolle	39
Abbildung 26 UV-Densitometrie der geschnittenen und aufgereinigten DNA.....	40
Abbildung 27 RNA-Kontrollgel in Agarose	40
Abbildung 28 RIA von TBG aus Xenopus-Oozyten	41
Abbildung 29 SDS-PAGE eines Retikulozytenlysates.....	42
Abbildung 30 Expression von Proteinen durch Injektion von sRNA in Xenopus-Oozyten.....	44
Abbildung 31 SDS-PAGE von TBG aus dem Medium von Xenopus Oozyten	46
Abbildung 32 SDS-PAGE von Xenopus-exprimiertem TBG N und mAllGly	47
Abbildung 33 Vergleich der Bindungsaffinitäten	48
Abbildung 34 Vergleich von N-TBG und Glykosylierungsmutanten 1-5	49
Abbildung 35 Scatchard-Analyse des Normal-TBGs aus Xenopus-Oozyten	50

Abbildung 36 Scatchard-Analyse der Mutante mGly1-TBG aus Xenopus Oozyten	50
Abbildung 37 Scatchard-Analyse aller fünf Mutanten und des Wildtyp-TBGs („Normal“)	51
Abbildung 38 pSelect-Vektor mit TBG-Insert	81
Abbildung 39 Oligonukleotide für die Mutagenese der N-Glykosylierungsstellen des TBG ...	83

9 Literaturverzeichnis

- Ain, K. B., Y. Mori, et al. "Reduced clearance rate of thyroxine-binding globulin (TBG) with increased sialylation: A mechanism for estrogen induced elevation of serum TBG concentration." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* , 1987: 65: 689-69.
- Alberts, B., Bray, D. et al. *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. Weinheim: Wiley-VCH, 1998.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A. et al. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. Weinheim: Wiley-VCH, 2012.
- Altmeyer, Prof. Dr. med. Peter. *Altmeyers Enzyklopädie*. 03 01, 2020.
<https://www.enzyklopaedie-dermatologie.de/dermatologie/serinprotease-19724>.
- Araki K, Nagata K. "Protein folding and quality control in the ER." *old Spring Harb Perspect Biol.*, Nov 1, 2011 : 3(11).
- Avvakumov, G. V., S. Warmels-Rodenhiser, et al. "Glycosylation of human corticosteroid-binding globulin at asparagine 238 is necessary for steroid binding." *Journal of Biological Chemistry*, 1993: 268: 862-866.
- Bartalena, L. "Recent achievements in studies on thyroid hormone-binding proteins." *Endocrine Reviews*, 1990: 11: 47-64.
- Benvenga, S., H. J. Cahnmann, et al. "Thyroid hormone binding to isolated human apolipoproteins A-II, C-I, C-II, and C-III." *Thyroid* , 1994: 4: 261-267.
- Berg, J., Stryer, L., Tymoczko, J. et al. *Biochemie*. Heidelberg: Springer Spektrum, 2012.
- Bertenshaw, R., D. Sarne, et al. "Sequencing of the variant thyroxine-binding globulin (TBG) - San Diego reveals two nucleotide substitutions." *Biochimica et Biophysica Acta* , 1992: 1139: 307-310.
- Blanchard, V, Liu, X. et al. "N-glycosylation and biological activity of recombinant human alpha1-antitrypsin expressed in a novel human neuronal cell line." *wileyonlinelibrary.com*. May 5, 2020.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/bit.23158>.
- Burr, W. A., D. B. Ramsden, et al. "Hereditary abnormalities of thyroxine-binding globulin concentration." *Quarterly Journal of Medicine*, 1980: 49: 295-313.
- Büttner, C., B. Chen, et al. "An additional glycosylation site within the putative ligand binding domain of thyroxine-binding globulin abolishes thyroxine binding." *67th Annual Meeting of the American Thyroid Association*, . Orlando, FL, 1993.
- Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. "Molecular aspects of thyroid hormone actions ." *Endocr Rev.*, Apr 31, 2010: (2):139-70.
- Clerc, F., Reiding, K., Jansen, B., Kammeijer, G. "Human plasma protein N -glycosylation." *Glycoconj J*, Nov 10, 2015: 309–343.
- Cobb, B. "The history of IgG glycosylation and where we are now." *Glycobiology*, Mar 20, 2020: 30(4):202-213.
- Colman, A. *Translation of Eukaryotic Messenger RNA in Xenopus Oocytes. Transcription and translation: A practical approach*. Washington D.C., IRL Press : B. D. Hames and S. J. Higgins., 1984.

- Copping, S., Byfield, P. G. H. "Thyroxine-binding globulin deficiency re-examined." *Clinical Endocrinology*, 1988: 28: 45-50.
- Cumming, Dale. "Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications." *Glycobiology*, Mar 1991: Volume 1, Issue 2115–130.
- Daiger, S. P., Wildin, R.S. "Human thyroxine-binding globulin (TBG): Heterogeneity within individuals and among individuals demonstrated by isoelectric focusing." *Biochemical Genetics* , 1981: 19: 673-685.
- Davis, Paul J., Lin, Hung-Yun, Hercbergs, Aleck A. , Keating, Kelly A., Mousa , Shaker A. "How Thyroid Hormone Works Depends on Cell Type, Receptor Type, and Hormone Analogue: Implications in Cancer Growth." *Discov Med.*, Feb; 27, 2019: (147):111-117.
- Dey, A., Shaik, S. "A Comparison of Glycomics in Prokaryotes and Eukaryotes." *Journal of Glycomics & Lipidomics*, Sep 18, 2016: 6:3.
- Engh, R., H. Loebermann, et al. "The S-variant of human α 1-antitrypsin, structure and implications for function and metabolism." *Protein Engineering*, 1989: 3: 407 - 415.
- ensembl.org. Apr 08, 2020.
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?g=ENSG00000123561;r=X:106032435-106038727.
- ensembl.org, human.
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000123561;r=X:106055137-106061431. Prod. HGNC. 03 08, 2020.
- Ferris, S., Kodali, V., Kaufman, R. "Glycoprotein folding and quality-control mechanisms in protein-folding diseases." *Disease Models & Mechanisms*, 2014 : 7: 331-341.
- Fitch, N. J. S., M. T. Akbari, et al. "An inherited non-amyloidogenic transthyretin variant, [Ser6]-TTR, with increased thyroxine-binding affinity, characterized by DNA sequencing." *Journal of Endocrinology*, 1991: 129: 309-313.
- Flink IL, Bailey TJ et al. "Complete amino acid sequence of human thyroxine-binding globulin deduced from cloned DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A.* , Oct 1986 : 83(20):7708-12.
- Flintegaard, Thomas V. , Thygesen, Peter, Rahbek-Nielsen, Henrik, Lavery, Steven B. , Kristensen, Claus, Clausen, Henrik, Bolt, Gert. "N-Glycosylation Increases the Circulatory Half-Life of Human Growth Hormone ." *Endocrinology*, Nov 1, 2010: Volume 151, Issue 11, 5326–5336.
- Flury, I. "Glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in "Saccharomyces cerevisiae" : characterization of proteins involved in side chain modifications." *Dissertation*. Universität Freiburg, Dez 13, 2001.
- Gärtner, R., R. Henze, et al. "Thyroxine-binding globulin: Investigation of microheterogeneity." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 52: 657-664., 1981: 52: 657-664.
- Gereben, Balazs, Zavacki, Ann Marie, Ribich, Scott, Kim, Brian W., Huang, Stephen A., Simonides, Warner S., Zeo, Aniko, Bianco, Antonio C. "Cellular and Molecular Basis of Deiodinase-Regulated Thyroid Hormone Signaling." *Endocrine Reviews*, 29 7, 2009: 898–938.

- Gershengorn, M.C., S Y Cheng, S. Y. et al. "Characterization of Human Thyroxine-binding Globulin ." *The Journal of Biological Chemistry*, Dec 10, 1977: 252, 8713-8718.
- Gettins, P., P. A. Patston et al. "Structure and mechanism of action of serpins." *Hematology/oncology clinics of North America*, 1992: Band 6, Nr. 6, S. 1393–1408.
- Gold, E. and A. Vladutiu. "Iatrogenic Hyperthyroidism of Long Duration in an Individual with Thyroxine-Binding Globulin Deficiency." *Clinical Chemistry*, 1994: 40: 2323-2324.
- Grimaldi, S., H. Edelhofer, et al. "Effects of thyroxine binding on the stability, conformation, and fluorescence properties of thyroxine-binding globulin." *Biochemistry*, 1982: 21: 145-150.
- Gross, R., Schölmerich, P, Gerok, W. *Die innere Medizin*. Stuttgart: Schattauer, 1999.
- Hamilton, S., Bobrowicz, P., Bobrowicz, B., et al. "Production of Complex Human Glycoproteins in Yeast." *Science* , Aug 29, 2003: Vol. 301, Issue 5637, pp. 1244-1246.
- Heit, C., Jackson, B.C, McAndrews, M. et al. "Update of the human and mouse SERPIN gene family." *Human Genomics*, 2013: 7:22.
- Higel, F., Seidl, A. et al. "N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* , Jan 2016: 941-100.
- Hnikowa, O., E. Ivaskova, et al. "Partial deficiency of thyroxine-binding globulin: an HLA study." *Hormon Research* , 1993: 40: 201 - 203.
- Hofsteenge, J., Müller D., et al. "New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us." *Biochemistry*, Nov 22, 1994: 33(46):13524-30.
- Horn, K., Kubiczek, Th., Pickardt, C.R., Scriba, P.C. "Thyroxin-bindendes Globulin (TBG): Präparation, radioimmunologische Bestimmung und klinisch-diagnostische Bedeutung." *Klin. Wschr.*, 1977: 55, 881-894.
- <http://goldbook.iupac.org>. Apr 04, 2020. <http://goldbook.iupac.org/terms/view/G02645>.
- Huber, R. and R. W. Carrell. "Implications of the three-dimensional structure of α_1 -antitrypsin for structure and function of serpins." *Biochemistry* , 1989: 28: 8951-8966.
- Huhtaniemi, Ilpo. *Encyclopedia of Endocrine Diseases*. Academic Press, 2018.
- Irving, J., Pike, R.N., Lesk, A. M., Whisstock, J. C. "Phylogeny of the Serpin Superfamily: Implications of Patterns of Amino Acid Conservation for Structure and Function." *Genome Research; Cold Spring Harbor Laboratory Press*, November 21, 2000: 1845-1864.
- Janssen O.E., Refetoff, S. "In vitro expression of thyroxine-binding globulin (TBG) variants. Impaired secretion of TBGPRO-227 but not TBGPRO-113." *The Journal of Biological Chemistry*, July 15, 1992: 267, 13998-14004.
- Janssen OE, Golcher HM, Grasberger H, Saller B, Mann K, Refetoff S. "Characterization of T(4)-binding globulin cleaved by human leukocyte elastase." *J Clin Endocrinol Metab*, 2002: 87(3):1217–1222.
- Janssen, O. E. and S. Refetoff. "In vitro expression of thyroxine-binding globulin (TBG) variants: Impaired secretion of TBGPro-227 but not TBGPro113." *Journal of Biological Chemistry*, 1992: 267: 13998-14004.

- Janssen, O. E., K. Takeda, et al. "Sequence of the variant thyroxine-binding globulin (TBG) in a Montreal family with partial TBG deficiency." *Human Genetics*, 1991: 87: 119-122.
- Janssen, O. E., R. Bertenshaw, et al. "Molecular basis of inherited thyroxine-binding globulin defects." *Trends in Endocrinology and Metabolism* , 1992: 3: 49-53.
- Janssen, O.E., Golcher, H., et al. "Characterization of T₄-Binding Globulin Cleaved by Human Leukocyte Elastase." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2002: 87(3):1217–1222.
- Jarvis, J. A., S. L. A. Munro, et al. "Homology model of thyroxine binding globulin and elucidation of the thyroid hormone binding site." *Protein Engineering* , 1992: 5: 61-67.
- Kambe, F., H. Seo, et al. "An additional carbohydrate chain in the variant thyroxine-binding globulin-Gary (TBGAsn-96) impairs its secretion." *Molecular Endocrinology*, 1992: 6: 443-449.
- Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. Stuttgart: Thieme-Verlag, 2005.
- Keller, Robert. *Immunologie und Immunpathologie*. Stuttgart: Thieme, 1994.
- Klein, R. Z., E. L. Carlton, et al. "Thyroid function in very low birth weight infants." *Clinical Endocrinology Oxford*, 1997: 47(4): 411-417.
- Kleine, B., and W. Rossmanith. *Hormone und Hormonsystem*. Berlin Heidelberg: Springer, 2007.
- Klinke, Rainer, und Stefan Silbernagl. *Lehrbuch der Physiologie*. Stuttgart: thieme, 2005.
- Krasnova, L., Wong, C. "Oligosaccharide Synthesis and Translational Innovation." *J Am Chem Soc.* , March 06, 2019 : 141(9): 3735–3754.
- Krebs, J. et al. *Lewin's GENES XII*. Mar: Jones and Bartlett Publishers, 2017.
- Kunkel, H.G., Wallenius, G. "New hemoglobin in normal adult blood." *Science*, Aug 12, 1955: 122(3163):288.
- Laemmli, U.K. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* , Aug 15, 1970: volume 227, pages680–685.
- Larkin, A., Imperiali, B. "The Expanding Horizons of Asparagine-Linked Glycosylation." *Biochemistry*, May 31, 2011: 50(21):4411-26.
- Lehninger, Albert L. *Prinzipien der Biochemie*. Berlin New York: Walter de Gruyter, 1987.
- Li, P., O. E. Janssen, et al. "Complete thyroxine-binding globulin (TBG) deficiency caused by a single nucleotide deletion in the TBG gene." *Metabolism*, 1991: 40: 1231-1234.
- Lomas DA, Elliott PR, Chang WS, Wardell MR, Carrell RW. "Preparation and characterization of latent alpha 1-antitrypsin." *J Biol Chem.* , 03 10, 1995 : 270(10):5282-8.
- Lucas A, Yaron JR et al. "Overview of Serpins and Their Roles in Biological Systems." *Methods Mol Biol.*, 2018: 1826:1-7.
- Marquardt, T., Helenius, A. "Misfolding and Aggregation of Newly Synthesized Proteins in the Endoplasmic Reticulum." *The Journal of Cell Biology*, May 3, 1992: Volume 117: 505-513.

- Marshall, J. S. and J. Pensky. "Studies on thyroxine-binding globulin (TBG). III. Some physical characteristics of TBG and its interaction with thyroxine." *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1971: 146: 76-83.
- Maynard, J, Burlingame, A., Medzihradszky, K. "Cysteine S-linked N-acetylglucosamine (S-GlcNAcylation), A New Post-translational Modification in Mammals." *Mol Cell Proteomics*, Nov 15, 2016 : (11): 3405–3411.
- Messner, P. "Prokaryotic Glycoproteins: Unexplored but Important ." *J Bacteriol.* , May 2004 : 186(9): 2517–2519. .
- Mimoto MS, Refetoff S. "Clinical recognition and evaluation of patients with inherited serum thyroid hormone-binding protein mutations." *J Endocrinol Invest.*, Jan 2020: 43(1):31-41.
- Mimoto, M. S., Refetoff, S. "Clinical recognition and evaluation of patients with inherited serum thyroid hormone-binding protein mutations." *Journal of Endocrinological Investigation*, July 27 , 2019: (2020) 43:31–41 .
- Miura, Y., F. Kambe, et al. "A truncated thyroxine-binding globulin due to a frameshift mutation is retained within the rough endoplasmic reticulum: A possible mechanism of complete thyroxine-binding deficiency in Japanese." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* , 1994: 78: 283-287.
- Miura, Y., Y. Mori, et al. "Sequence of the variant thyroxine-binding globulin (TBG) in a family with partial TBG deficiency in Japanese (TBG-PDJ)." *Endocrinology Japonica* , 1993: 40: 127-132.
- Moens S., Vanderleyden J. "Glycoproteins in prokaryotes." *Arch Microbiol.*, Sep 1997: 168(3):169-75.
- Mori, Y., S. Refetoff, et al. "Detection of the thyroxine-binding globulin (TBG) gene in six unrelated families with complete TBG deficiency." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1988: 67: 727-733.
- Mori, Y., Seino, S. et al. "A Mutation Causing Reduced Biological Activity and Stability of Thyroxine-Binding Globulin Probably as a Result of Abnormal Glycosylation of the Molecule." *Molecular Endocrinology*, Mar 1, 1989: Volume 3, Issue 3, 575–579.
- Mori, Y., Y. Miura, et al. "Precise localization of the human thyroxine-binding globulin gene to chromosome Xq22.2 by fluorescence in situ hybridization." *Human Genetics* , 1995: 96: 481-482.
- Murata Y, Magner JA, Refetoff S. "The role of glycosylation in the molecular conformation and secretion of thyroxine-binding globulin." *Endocrinology*, Apr 1986: 118(4):1614-21.
- Murata, Y., D. H. Sarne, et al. "Characterization of thyroxine-binding globulin secreted by a human hepatoma cell line." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* , 1985: 60: 472-478.
- Murata, Y., S. Refetoff, et al. "Variant thyroxine-binding globulin in serum of Australian Aborigines: Its physical, chemical and biological properties." *Journal of Endocrinological Investigation* , 1985: 8: 225-232.
- Murken, J., Grimm, T., Holinski-Feder, E. *Humangenetik*. Stuttgart: Thieme, 2006.

- Nelson, D., Cox, M. *Lehninger Biochemie*. Springer, 2008.
- NIH.gov. "National Institute of Health NIH, Gendatenbank." <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Apr 08, 2020. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000354.
- Nordheim, A., Knippers, R. et al. *Molekulare Genetik*. Stuttgart: Thieme, 2015.
- Okamoto, H., Y. Mori, et al. "Molecular analysis of females manifesting thyroxine-binding globulin (TBG) deficiency: selective x-chromosome inactivation responsible for the difference between phenotype and genotype in TBG-deficient females." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* , 1996: 81: 2204-2208.
- Pemberton, P. A., P. E. Stein, et al. "Hormone binding globulins undergo serpin conformational change in inflammation." *Nature*, 1988: 336: 257-258.
- Prabakaran, D. , Ahima, R.S. , Harney, J.W. , Berry, M.J. , Larsen, P.R. , Arvan, P. "Polarized targeting of epithelial cell proteins in thyrocytes and MDCK cells." *Journal of Cell Science*, 03 23, 1999: 112, 1247-1256.
- Refetoff, S. and Y. Murata. "X-chromosome-linked inheritance of the variant thyroxine-binding globulin in serum of Australian Aborigines: Its physical, chemical and biological properties." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* , 1985: 60: 356-36.
- Refetoff, S. "Inherited thyroxine-binding globulin abnormalities in man: update 1994." *Endocrine Reviews Monograph*, Mar 1994: 3: 162-164.
- Refetoff, S. "Thyroid Hormone Serum Transport Proteins." *endotext.org*. Jun 7, 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/emedien.ub.uni-muenchen.de/pubmed/?term=NBK285566%2F> (accessed 05 03, 2020).
- Refetoff, S., F. E. Dwulet, et al. "Reduced affinity for thyroxine in two of three structural thyroxine-binding prealbumin variants associated with familial amyloidotic polyneuropathy." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1986: 63: 1432-143.
- Refetoff, S., V. S. Fang, et al. "Studies on human thyroxine-binding globulin (TBG): IX. Some physical, chemical, and biological properties of radioiodinated TBG and partially desialylated TBG." *Journal of Clinical Investigation* , 1975: 56: 177-187.
- Refetoff, S., Y. Murata, et al. "Thyroxine-binding globulin: Organization of the gene and variants." *Hormone Research* , 1996: 45: 128-138.
- Refetoff, Samuel. "Inherited thyroxine-binding globulin abnormalities in man." *Endocrine Reviews*, Aug 10, 1989: 275-293.
- Refetoff, Samuel, and Y. Murata. "Radioimmunoassays specific for the tertiary and primary structures of thyroxine-binding globulin (TBG): Measurement of denatured TBG in serum." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1984: 59: 269-277.
- Richardson, S. J., A. J. Bradley, et al. "Evolution of marsupial and other vertebrate thyroxine-binding plasma proteins." *American Journal of Physiology* , 1994: 266: R1359-R1370.
- Robbins, J., S. Y. Cheng, et al. "Thyroxine transport proteins of plasma. Molecular properties and biosynthesis." *Recent Progress in Hormone Research* , 1978: 84: 477-518.

- Robinson, P. A. and G. L. Hammond. "Identification and Characterization of a human corticosteroid-binding globulin variant with a reduced affinity for cortisol." *Journal of Endocrinology* , 1985: 104: 269.
- Roth, J., Zuber, C., Park, S., Jang, I., Lee, Y. "Protein N-glycosylation, protein folding, and protein quality control." *Molecules and Cells*, Nov 26, 2010: volume 30, pages 497–506.
- Sandler, Ben, Webb, Paul, Apriletti, James W., Huber, B. Russell, Togashi, Marie. "Thyroxine-Thyroid Hormone Receptor Interactions." *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 12 31, 2004: Vol. 279, No. 53, pp. 55801–55808, 2004.
- Scatchard, G. "The attractions of proteins for small molecules and ions." *Annals New York Academy of Sciences*, 1949: 51: 660-672.
- Schulze, A. J., R. Huber, et al. "Structural aspects of serpin inhibition." *FEBS Letters* , 1994: 344: 117-124.
- Schussler, G. C. "The Thyroxine-Binding Proteins." *Thyroid*, Feb 10, 2000: (2):141-9.
- Shental-Bechor, D., Levy, Y. "Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization." *PNAS*, Jun 17, 2008: 105: 8256–8261.
- Sieber P., Platzer M., Schuster S. "The Definition of Open Reading Frame Revisited." *Trends Genet.*, Mar 2018 : 34(3):167-170.
- Silbernagl, Stefan. *Taschenatlas der Physiologie*. Thieme: Stuttgart, 2018.
- Silbernagl, Stefan, Klinke, Rainer. *Lehrbuch der Physiologie*. Stuttgart: Thieme, 2001.
- Silverman, Gary A., et al. "The Serpins Are an Expanding Superfamily of Structurally Similar but Functionally Diverse Proteins." *J. Biol. Chem.*, 9 7, 2001: 276:33293-33296.
- Simard, M., Underhill, C. et al. "Functional implications of corticosteroid-binding globulin N-glycosylation." *J Mol Endocrinol.*, Feb 2018: 60(2): 71–84.
- Sinclair AM, Elliott S. "Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins." *J Pharm Sci.*, Aug 2005 : 94(8):1626-35.
- Soheilipour, F., Fazilaty, H. et al. "First report of inherited thyroxine-binding globulin deficiency in Iran caused by a known de novo mutation in SERPINA7." *Mol Genet Metab Rep.*, Sep 8, 2016: 13-16.
- Song, Y., Driessens, N., Costa, M. "Roles of Hydrogen Peroxide in Thyroid Physiology and Disease." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* , 2007: 92(10):3764–3773.
- Spektrum der Wissenschaft*. 03 12, 2020.
<https://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/molekulare-chaperone/4036>.
- Stein PE, Carrell RW. "What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease?" *Nat Struct Biol.*, Feb 2, 1995: (2):96-113.
- Su D., Zhao H., Xia H. "Glycosylation-modified erythropoietin with improved half-life and biological activity." *Int J Hematol.*, Mar 2010: 91(2):238-44 .
- Takamatsu, J. and S. Refetoff. "Inherited heat-stable variant thyroxine-binding globulin (TBG-Chicago)." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* , 1996: 63: 1140-1144.

- Takamatsu, J., M. Ando, et al. "Isoelectric focussing variant thyroxine-binding globulin in American Blacks: Increased heat lability and reduced serum concentration." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* , 1986: 63: 80-87.
- Takamatsu, J., S. Refetoff, et al. "Two new inherited defects of the thyroxine-binding globulin (TBG) molecule presenting as partial TBG deficiency." *Journal of Clinical Investigation* , 1987: 79: 833-840.
- Taylor. M., Drickamer, K. *Introduction to Glycobiology*. Oxford University Press, 2011.
- Tessier, F. "The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors." *j .patbio*, Sep 14, 2009.
- Torpy, D.J., Lundgren, A.B., et al. "CBG Santiago: A Novel CBG Mutation." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Jan 1, 2012: Volume 97, Issue 1, E151–E155. [uniprot.org](https://www.uniprot.org/help/carbohydr). Apr 09, 2020. <https://www.uniprot.org/help/carbohydr>.
- Van den Berg, K.J., van Raaij, J. A. G. M., Bragt, P.C., Notten, W. R. F. "Interactions of halogenated industrial chemicals with transthyretin and effects on thyroid hormone levels in vivo." *Archives of Toxicology*, 1991: volume 65, pages 15–19.
- Vaupel, Peter, Schaible, Hans-Georg. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*. Stuttgart: Wiss. Verlagsgesellschaft, 2015.
- Weikum, Emily R., Liu, Xu, Ortlund, Eric A. "The nuclear receptor superfamily: A structural perspective." *Protein Sci.*, Nov 27, 2018: (11): 1876–1892.
- Xu, C., and D. Ng. "Glycosylation-directed quality control of protein folding." *Nat Rev Mol Cell Biol.*, Dez 16, 2015: (12):742-52.
- Yamamori, I., Y. Mori, et al. "Nucleotide deletion resulting in frameshift as a possible cause of complete thyroxine-binding globulin deficiency in six Japanese families." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* , 1991: 73: 262-267.
- Zhou, A., Wei, Z., Read, R.J., Carrell, R.W. <https://www.rcsb.org/structure/2CEO>. 08 14, 2006. <https://www.rcsb.org/structure/2CEO> (accessed 03 08, 2020).
- Zhou, A., Zhenquan Wei, Z. et al. "Structural mechanism for the carriage and release of thyroxine in the blood." *PNAS*, Sep 5, 2006: 103 (36) 13321-13326.
- Ziegler, R., Pickardt, C.R., Willig, R.-P. *Rationelle Diagnostik in der Endokrinologie*. Stuttgart: Thieme, 1993.
- Zinn AB, Marshall JS, Carlson DM. "Carbohydrate structures of thyroxine-binding globulin and their effects on hepatocyte membrane binding." *J Biol Chem.*, Oct 10, 1978 : 253(19):6768-73.

10 Danksagung

Herrn em. Prof. Dr. Dr. h.c. Peter C. Scriba möchte ich danken für die Übernahme der Arbeit und seine lange Geduld, auf die schriftliche Fassung zu warten. Auch danke ich ihm sehr für die Möglichkeit, dass ich die Arbeit im Labor der Medizinischen Klinik des Klinikums Innenstadt durchführen konnte. Er sorgte dort jahrelang für sehr gute Rahmenbedingungen zum Arbeiten in der medizinischen Grundlagenforschung, ohne die eine vernünftige Weiterentwicklung moderner Therapien nicht denkbar wäre.

Herrn Prof. Dr. med. Roland Gärtner danke ich sehr für die Unterstützung bei dieser Arbeit und seinen kritischen Blick auf Text und Inhalt. Ohne ihn wäre sie keinesfalls fertig geworden.

Herrn Prof. Dr. med. Onno E. Janßen gilt mein Dank für die Betreuung im Labor und die Idee zum Thema der Arbeit.

Frau Bettina Treske danke ich für ihre Hilfe im Labor, für ihre praktische Erfahrung als langjährige MTA und für ihr fröhliches Wesen, das mich durch manchen trüben Tag gerettet hat, wenn wieder einmal nichts so funktionierte, wie ich es gern wollte.

Außerdem möchte ich bei allen anderen Kolleg*innen danken, die insbesondere den „Labortrakt“ der Endokrinologie mit fachlichem und menschlichem Inhalt füllten und mir in den Jahren meines Wirkens Wegbegleiter und Forschungsgefährten waren.

Ich schreibe diese Danksagung mitten in der Coronakrise, die uns allen einmal mehr zeigt, wie wichtig fundierte Grundlagenforschung und eine sehr gute ärztliche Versorgung für unser aller Leben und unsere Gesellschaft ist. Wir sollten nicht fragen, was das Gesundheitssystem kostet, sondern was uns Gesundheit wert ist.

Danke an das gesamte medizinische Personal, auf jeder Ebene, für die Bereitschaft, ihr Leben und Wirken in den Dienst der Gesundheit Dritter zu stellen.

11 Eidesstattliche Versicherung

Wagner, Sandra

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Glykosylierungen des Thyroxin-bindenden Globulins

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Kirchheim, den 13.11.2020
Ort, Datum

Sandra Wagner
Unterschrift Doktorandin